



**Dânia Marques
Eira**

**Mutagénese por transposição no genoma de
*Aeromonas hydrophila***



**Dânia Marques
Eira**

**Mutagénese por transposição no genoma de
*Aeromonas hydrophila***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Carlos Matias Correia, Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação científica da Doutora Ana Sofia Direito dos Santos Duarte, Investigadora em Pós-doutoramento, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Tânia Isabel Sousa Caetano
investigadora do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
professor catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Sofia Direito dos Santos Duarte
investigadora em Pós-doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Prof. Doutor António Correia, meu orientador, por me ter recebido no seu laboratório, por me ter apoiado e ter sempre a palavra certa para dizer. Obrigada por me ter concedido a oportunidade da realização deste trabalho.

À minha orientadora Dra. Ana Sofia Duarte, pela ajuda constante em todo o meu percurso, por toda a confiança depositada em mim, pelo apoio, pela imensa disponibilidade e amizade e principalmente por me ter feito acreditar que as coisas eram possíveis mesmo quando não corriam tão bem.

À Cristina, pelas sugestões para a realização deste trabalho, pela paciência e disponibilidade que sempre demonstrou.

À equipa do MicroLab que sempre me apoiou em tudo o que precisei e sobretudo pela grande amizade que sempre demonstraram. Obrigada por todos os momentos que me proporcionaram ao longo de todo este tempo.

Aos amigos com quem tive a sorte de trabalhar, Susana, Eliana, Carina, Isabel e Carla, agradeço o ambiente de trabalho fantástico e a amizade foi sempre um incentivo para continuar. Obrigada pelas conversas e por todos os momentos especiais que passamos. Um agradecimento especial ao Filipe sobretudo pela grande amizade que demonstrou desde o primeiro momento, pelas “discussões” sem fundamento, pelas picardias e claro pela paciência que sempre teve, sem ele as coisas não seriam iguais.

À Nádía em especial, pelo apoio e amizade que sempre demonstrou, pela compreensão e estímulo sem nunca me deixar desistir e acreditar sempre em mim mais do que eu, pelas sugestões essenciais para a realização deste trabalho e pela total disponibilidade. Obrigada por seres sempre a minha salvação.

Aos meus amigos, em especial à Joana, à Cátia, à Mónica, à Catarina e à minha prima Patrícia que apesar da distância sempre me ouviram e me apoiaram sempre precisei. Obrigada por todas as gargalhadas que sempre me propuseram.

Ao Tiago, por todo o tempo que não lhe dediquei, pelo carinho, compreensão e apoio incondicional.

À minha família que sempre me apoiou quando eu mais precisei e pela sua alegria contagiante. Em especial aos meus pais que são os principais responsáveis por eu ter chegado até aqui, obrigada por todos os sacrifícios que fizeram por mim e pelo apoio e compreensão.

palavras-chave

β -lactâmicos; mutagênese por transposição; *Aeromonas*; resistência a antibióticos

resumo

Espécies de *Aeromonas* são reconhecidas como agentes etiológicos de amplo espectro de doenças em humanos e animais. São muito comuns em águas de consumo e em diferentes tipos de alimentos, especialmente frutos do mar. A resistência de *Aeromonas* spp. aos antibióticos vulgarmente usados, é um assunto de preocupação, devido à natureza ubíqua desses organismos. A resistência a antibióticos em *Aeromonas* está relacionada com vários mecanismos, ao passo que, a resistência codificada cromossomicamente por β -lactâmicos é particularmente relevante devido à ampla utilização destes antibióticos. A expressão coordenada de β -lactamases induzidas cromossomicamente é considerada o mecanismo principal de resistência a β -lactâmicos, em *Aeromonas* sp. No entanto, os mecanismos precisos da sua regulamentação ainda não estão claros.

O objetivo deste estudo é a elaboração de uma biblioteca de mutantes para *A. hydrophila*, com o intuito de identificar novos determinantes genéticos que possam estar envolvidos na regulação do mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos, podendo constituir novos alvos de aplicação terapêutica.

Os mutantes obtidos foram testados para a suscetibilidade aumentada ou diminuída à ampicilina, cefotaxima e imipenemo. O perfil de sensibilidade foi medido por microdiluição. Uma vez que, foi demonstrado que as células em biofilmes são geralmente mais resistentes à quimioterapia do que as células planctônicas, os mutantes também foram avaliados quanto à sua capacidade de formar biofilmes num ensaio em placa de microtitulação utilizando coloração com violeta de cristal.

Esta abordagem permitiu a identificação de 17 mutantes que apresentam fenótipos de resistência alterados: 5 mutantes mostraram aumentar a suscetibilidade ao IMP, 11 apresentaram diminuição da suscetibilidade à CTX e 1 mutante, quando comparado com a estirpe parental, mostrou aumento da suscetibilidade ao IMP e diminuição da suscetibilidade à CTX. Além disso, todos os 17 mutantes apresentaram também alterações reprodutíveis na sua capacidade de formação de biofilme.

Por sequenciação da região que flanqueia o transposão de 4 mutantes, foram identificados os genes seguintes que codificam proteínas envolvidas na resistência a β -lactâmicos: uma proteína reguladora da transcrição, uma ATPase, uma GDP-manose 4,6-desidratase e uma proteína hipotética com função desconhecida.

keywords

β -lactams; transposon mutagenesis; *Aeromonas*; antibiotic resistance

abstract

Aeromonas species are recognized as etiological agents of a wide spectrum of diseases in humans and animals. They are very common in drinking waters and in different types of foods, particularly seafood. Resistance of *Aeromonas* spp. to commonly used antibiotics is a matter of concern due to the ubiquitous nature of these organisms. Antibiotic resistance in *Aeromonas* is related to several in which the chromosomally encoded resistance to β -lactams is particularly relevant due to the wide use of these antibiotics. The coordinated expression of chromosomally inducible β -lactamases is considered a main mechanism of resistance to β -lactams in *Aeromonas* sp. Nevertheless, the precise mechanisms of its regulation are still unclear.

The objective of this study is to develop a library of mutants of *A. hydrophila*, in order to identify new genetic determinants that could be involved in regulation mechanism of resistance to β -lactam antibiotics, and may constitute novel targets for therapeutic application.

The mutants obtained were screened for either increased or decreased susceptibility to ampicillin, cefotaxime and imipenem. The susceptibility profile was measured by broth dilution. Since it has been shown that cells in biofilms are generally more resistant to antimicrobial chemotherapies than planktonic cells, the mutants were also evaluated for their ability to form biofilms in a microtitre plate assay using crystal violet staining.

This approach allowed the identification of 17 mutants presenting altered resistance phenotypes: 5 mutants revealed to increase the susceptibility to imipenem, 11 showed reduction of the susceptibility to cefotaxime and 1 mutant, when compared with the parental lineage, showed an increase of susceptibility to imipenem and a decrease of susceptibility to cefotaxime. Furthermore, all the 17 mutants also presented reproducible alterations in their capability of biofilm formation.

By sequencing the transposon flanking region of 4 mutants, the following genes encoding proteins involved in the resistance to β -lactams were identified: a transcriptional regulatory protein, an ATPase, a GDP-mannose 4,6-dehydratase and a hypothetical protein with unknown function.

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
I. INTRODUÇÃO	1
1. O GÊNERO <i>AEROMONAS</i>	3
1.1 DESCRIÇÃO DO GÊNERO E SUA TAXONOMIA.....	3
1.2 <i>AEROMONAS HYDROPHILA</i>	5
2. RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS	6
2.1 ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS	6
2.2 MODO DE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS	8
2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS	9
2.3.1 Alteração das proteínas bacterianas alvo (PBPs)	10
2.3.2 Alteração da permeabilidade da membrana	11
2.3.3 Desenvolvimento de sistemas eficazes de efluxo.....	12
2.3.4 Hidrólise enzimática mediada por β -lactamases	13
2.3.4.1 Classificação de β -lactamases	14
2.3.4.2 β -lactamases no gênero <i>Aeromonas</i>	15
3. GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS.....	17
4. FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	19
5. INTERESSE E IMPORTÂNCIA.....	22
6. BIBLIOTECAS DE MUTANTES.....	23
II. OBJETIVOS	25
III. MATERIAL E MÉTODOS	29
1. ESTIRPE BACTERIANA E TRANSPOSIÇÃO.....	32
2. MEIOS DE CULTURA	32
2.1 ADITIVOS AOS MEIOS DE CULTURA: ANTIBIÓTICOS	33
3. CONSERVAÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	33
4. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE ISOLADOS BACTERIANOS	34
5. HIDRÓLISE DE DNA POR ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO	35
6. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR PCR	36
7. ELETROFORESE DE DNA.....	37
7.1 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....	37
7.2 MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE ÁCIDOS NUCLEICOS	37
7.3 VISUALIZAÇÃO DE DNA	37
8. PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR	38
9. TRANSFERÊNCIA DE FRAGMENTOS DE DNA SEPARADOS EM GEL DE AGAROSE PARA MEMBRANAS DE NYLON	38
10. DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS POR HIBRIDAÇÃO DNA-DNA	39
10.1 MARCAÇÃO NÃO RADIOATIVA DE SONDAS DE DNA.....	40
10.1.1 Método random primed.....	40
10.1.2 Incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR.....	41
10.2 HIBRIDAÇÃO.....	41
10.3 LAVAGENS DAS MEMBRANAS E DETECÇÃO	42
11. CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES	43

11.1	PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES.....	44
11.2	ELETROPORAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES	45
11.2.1	<i>Controlo da eletroporação</i>	45
11.3	SELEÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS MUTANTES	46
11.4	CRIOPRESERVAÇÃO DOS MUTANTES	46
12.	CARACTERIZAÇÃO DA BIBLIOTECA DE MUTANTES	46
12.1	VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DA MUTAÇÃO	46
12.2	AValiação DA ALEATORIEDADE DAS MUTAÇÕES.....	47
13.	AValiação FENOTÍPICA DOS MUTANTES	47
13.1	DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS.....	47
13.2	DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME	49
14.	IDENTIFICAÇÃO DOS MUTANTES.....	50
14.1	RATE-PCR	50
14.2	DETEÇÃO DO LOCAL DE INSERÇÃO	51
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
1.	CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE MUTANTES.....	55
1.1	PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES E ELETROPORAÇÃO	55
2.	CARACTERIZAÇÃO DA BIBLIOTECA DE MUTANTES	58
2.1	VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DA MUTAÇÃO	58
2.2	AValiação DA ALEATORIEDADE DAS MUTAÇÕES	59
3.	AValiação FENOTÍPICA DOS MUTANTES	61
3.1	DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS	61
3.2	DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME	66
3.3	FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	68
4.	IDENTIFICAÇÃO DOS MUTANTES.....	71
4.1	RATE-PCR	71
4.2	IDENTIFICAÇÃO DOS LOCAIS DE INSERÇÃO E SUAS IMPLICAÇÕES	73
4.2.1	<i>Mutante 1</i>	75
4.2.2	<i>Mutante 2</i>	76
4.2.3	<i>Mutante 41</i>	78
4.2.4	<i>Mutante 52</i>	79
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
V.	CONCLUSÕES	81
VI.	PERSPETIVAS FUTURAS.....	85
VII.	BIBLIOGRAFIA	89
VIII.	ANEXOS	103

Lista de abreviaturas

A: adenina

Abs: absorvância

Amp: ampicilina

Amp^R: resistência à ampicilina

atm: atmosfera

C: citosina

CECT: *Colección Española de Cultivos Tipo*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

cm: centímetro

dATP: desoxiadenosina-5'-trifosfato

dCTP: desoxicitidina-5'-trifosfato

dGTP: desoxiguanidina-5'-trifosfato

DIG: digoxigenina

DMSO: *Dimethyl sulfoxide*

DNA: ácido desoxiribonucleico

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DO: densidade ótica

dTTP: desoxitimidina-5'-trifosfato

dUTP: desoxiuridina-5'-trifosfato

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EPA: *Environmental Protection Agency*

EtBr: brometo de etídeo

g: grama

G: guanina

h: horas

HCl: ácido clorídrico

HG: *Hybridization groups*

Imp: Imipenemo

Imp^R: resistência ao imipenemo

KCl: cloreto de potássio

Kan^R: resistência à canamicina

l: litro

M: molar

mBar: miliBar

mg: miligrama

MIC: *Minimal Inhibitory Concentration*

min.: minuto

ml: mililitro

mM: milimolar

NBT: *Nitroblue Tetrazolium Salt*

ng: nanograma

nm: nanometro

OM: membrana externa

OMP: proteína da membrana externa

pb: pares de bases

PBPs: *Penicillin Binding Proteins*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

rpm: rotações por minuto

SSC: citrato de sódio salino

sub-MIC: concentração de antibiótico inferior ao valor de MIC

T: timina

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TE: Tris-EDTA

TCS: sistema de dois componentes

U: unidades de enzima

UV: ultravioleta

V: volts

µg: micrograma

μl : microlitro

μm : micrometro

μM : micromolar

Lista de figuras

Figura 1 – Estruturas químicas de antibióticos β -lactâmicos

Figura 2 – Estrutura das β -lactamases nas suas respectivas classes. Estão representadas as β -lactamases SHV-1, IMP-1, P99 e OXA-1

Figura 3 – Sistema de dois componentes que regula a expressão de β -lactamases em *Aeromonas* proposto por Tayler e os seus colaboradores.

Figura 4 – Resistência a antibióticos em biofilmes.

Figura 5 – Representação esquemática das metodologias utilizadas ao longo deste trabalho.

Figura 6 – Resultados da eletroporação em LB (A) e GSP (B) suplementados com 100 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina. A – Mutantes de *E. coli* (kan^R), resultantes da eletroporação. B – Mutantes de *A. hydrophila* (kan^R), resultantes da eletroporação.

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR obtidos para amplificação do gene de resistência à canamicina inserido no transposão.

Figura 8 – Hibridação dos mutantes.

Figura 9 – Mapa de restrição do transposão EZ-Tn5TM <KAN-2> (1221 pb) (Epicentre).

Figura 10 – Alterações da suscetibilidade ao imipenemo nos mutantes 1-48 (A) e mutantes 49-86 (B) e a respetiva estirpe parental (WT).

Figura 11 – Alterações da suscetibilidade à cefotaxima nos mutantes 1-48 (A) e 49-86 (B) e a respetiva estirpe parental (WT).

Figura 12 – Número de mutantes com alteração de fenótipo de resistência aos diferentes antibióticos β -lactâmicos (ampicilina, cefotaxima e imipenemo).

Figura 13 – Caracterização da biblioteca de mutantes relativamente ao fenótipo de resistência a antibióticos β -lactâmicos.

Figura 14 – Formação de biofilme dos mutantes 1-48 (A), 49-86 (B), calculada por determinação da razão Abs_{550} biofilme / Abs_{550} células planctónicas. A linha vermelha representa a formação de biofilme da estirpe parental.

Figura 15 – Representação das alterações dos fenótipos de resistência e capacidade de formação de biofilme dos 17 mutantes selecionados.

Figura 16 – Esquema representativo dos fenótipos de resistência e capacidade de formação de biofilme dos 17 mutantes selecionados.

Figura 17 – Perfil de bandas resultantes do produto do RATE-PCR. Estão representados os mutantes 1, 22, 28, 41 e 52.

Figura 18 – Marcador de peso molecular Gene Ruler™ DNA Ladder MIX (Fermentas)

Lista de tabelas

Tabela I – Identificação dos mutantes por transposição em *A. hydrophila*, com alteração dos fenótipos de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e capacidade de formação de biofilmes.

Tabela II – Oligonucleótidos usados neste estudo

I. INTRODUÇÃO

1. O género *Aeromonas*

1.1 Descrição do género e sua taxonomia

As *Aeromonas* são bactérias Gram-negativas, em forma de bastonete, anaeróbias facultativas, oxidase e catalase positivas, não formadoras de esporos e autóctones (Igbinosa et al., 2012; Kivanc, 2011). As *Aeromonas* são microrganismos amplamente distribuídos em ambientes aquáticos com uma notável relevância ecológica devido à sua ampla distribuição e abundância, estando disseminadas em habitats como solo, ou a água; entre os tipos de águas podemos encontrar estes organismos em águas salobras e doces, cloradas e não cloradas, estuarinas, do mar ou interiores (subterrâneas ou superficiais) águas de irrigação, e em alguns países, em água mineral engarrafada (Kivanc, 2011). Vários estudos sobre a taxonomia e nomenclatura de *Aeromonas* foram realizados ao longo dos anos e embora inicialmente posicionadas na família *Vibrionaceae*, mas estudos filogenéticos demonstraram que o género *Aeromonas* não está intimamente relacionado com *vibrios*. Face a estes resultados foi estabelecida a família *Aeromonadaceae* que acomodou o género *Aeromonas* (Abbott et al., 2003; Colwell, 1986).

A correta identificação de *Aeromonas* spp. tem ganho especial importância, dado o crescente envolvimento destes microrganismos em processos infecciosos em animais aquáticos e terrestres (Janda and Abbott, 2010). Nos últimos anos, têm sido frequentemente associados a um amplo espectro de doenças infecciosas em humanos (Janda and Abbott, 2010). As infeções causadas em humanos são devidas à exposição a águas, animais ou alimentos contaminados, sendo por isso responsáveis por doenças gastrointestinais, infeções de pele nomeadamente em feridas, infeções do trato respiratório e em alguns casos a septicémia hemorrágica fatal. A prevalência e a distribuição de *Aeromonas* em ambientes aquáticos, o seu papel como um possível contaminante dos sistemas de abastecimento de água potável e elevado potencial patogénico mediado por *Aeromonas* mesófilas levaram a que tenham sido consideradas por alguns autores, uma preocupação a nível da saúde pública (Dumontet et al., 2000; Gavriel, 1998; Kivanc, 2011). Atualmente, espécies de *Aeromonas* têm a capacidade inerente de crescer em sistemas de distribuição de água, especialmente em biofilmes (Chauret et al., 2001). Em 1968, Von Graevenitz Mensch reconheceu as *Aeromonas* como agentes patogénicos humanos e sugeriu que algumas estirpes poderiam estar

Introdução

associadas a doenças gastrointestinais, através da avaliação de 30 casos de infeção ou colonização de *Aeromonas* (Daskalov, 2006). Algumas espécies são comumente isoladas de amostras de fezes de crianças com idade inferior a cinco anos, enquanto que, em populações adultas, o seu isolamento a partir de outros locais do corpo é geralmente mais frequente. (Igbinosa et al., 2012).

Em meados dos anos 70, as *Aeromonas* foram divididas em dois grandes grupos com base nas propriedades fisiológicas e variedade de hospedeiros. As estirpes móveis que apresentavam uma temperatura ótima de crescimento de 35-37 °C (mesófilas) e eram responsáveis por uma variedade de infeções em humanos foram descritas como *Aeromonas hydrophila* (Janda and Duffey, 1988). As estirpes imóveis que cresciam a 22-28 °C (psicotróficas) e causavam infeções principalmente em peixes tais como salmonídeos, foram designadas por *Aeromonas salmonicida* (Janda and Duffey, 1988). Os marcadores fenotípicos para a realização da sua diferenciação incluíam a temperatura ótima de crescimento, mobilidade e a produção de indol (Martin-Carnahan, 2005)

Este género produz diversos tipos de enzimas hidrolíticas extracelulares e crescem de forma otimizada em faixas de temperatura entre 22 °C e 35 °C, mas algumas espécies podem também crescer entre 0-45 °C (Ghenghesh et al., 2008). Todas as espécies de *Aeromonas* resistem a gamas de pH 4,5-9, mas a gama de pH ótimo é de 5,5 a 9 e a uma gama de concentrações de cloreto de sódio é de 0 a 4% (Isonhood and Drake, 2002).

Enquanto que a taxonomia de estirpes psicotróficas se tem mantido relativamente estável, o número de espécies mesofílicas tem aumentado, à *A. hydrophila* juntaram-se a *A. sobria* e *A. caviae* (Popoff, 1981). Com base em estudos anteriormente realizados juntamente com uma série de trabalhos que se seguiram usando técnicas de hibridação DNA-DNA foram definidos 12 grupos designados por HG ("*hybridization groups*") (Popoff, 1981). Atualmente, o número de espécies descritas aumentou de 4 para 16 e por isso estão definidos 17 grupos de hibridação (Martin-Carnahan, 2005).

De acordo com a última edição do *Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey*, o género compreende as seguintes espécies: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* (*biovares sobria e veronii*), *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii*, *A. enteropelogenes*, *A. ichthiosmia*, *A. punctata* e os dois grupos de homologia de DNA,

Aeromonas sp. HG11 e *Aeromonas* sp. HG13 que permanecem sem nome (Martin-Carnahan, 2005; Saavedra et al., 2006). Recentemente, novas espécies foram descritas: *A. simiae*, *A. molluscorum*, *A. bivalvium*, *A. tecta*, *A. aquariorum*, *A. culicicola*, *A. diversa*, *A. fluvialis*, *A. piscicola*, *A. rivulli*, *A. sanarellii*, *A. sharmana* e *A. taiwanensis* (Alperi et al., 2010a; Alperi et al., 2010b; Beaz-Hidalgo et al., 2009; Demarta et al., 2008; Figueras et al., 2011; Harf-Monteil et al., 2004; Martinez-Murcia et al., 2008; Minana-Galbis et al., 2004, 2007; Minana-Galbis et al., 2010; Pidiyar et al., 2002; Saha and Chakrabarti, 2006).

1.2 *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila encontra-se no grupo de espécies móveis e mesofílicas, como já foi referido anteriormente, associadas a patologias em humanos. É a única espécie que causa patologias em populações de peixes e em humanos, sendo caracterizada como um agente patogénico oportunista (Seshadri et al., 2006).

Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila ATCC 7966^T é a estirpe tipo da espécie *A. hydrophila* e encontra-se depositada noutras coleções de culturas (exemplo: CECT 839, LMG 2844, DMS 30187). Em 2006, a sequência do seu genoma permitiu mostrar mecanismos que contribuem para a virulência e capacidade metabólica que possibilitam que o organismo cresça numa variedade de ecossistemas; explicando também como é que esta estirpe é capaz de sobreviver em ambientes poluídos, ou pobres em oxigénio e capaz de colonizar e causar doenças nos seres humanos e outros hospedeiros (Seshadri et al., 2006).

Entre as principais espécies de *Aeromonas*, *A. hydrophila* tem atraído a atenção devido à sua frequente associação com infeções em humanos. As infeções são principalmente encontradas em pacientes com uma história de acidente, onde houve exposição das feridas aos ambientes aquáticos contaminados, em indivíduos com imunodeficiência e geralmente estão associados com a meningite, endocardite, peritonite, síndrome hemolítico-urémico e septicemia (Barreto, 2010; Calhau et al., 2010; Minnaganti et al., 2000). Desde 1995 que as *Aeromonas* foram indicadas pela EPA (*Environmental Protection Agency*) como um organismo “patogénico emergente”, e a espécie *A. hydrophila* como indicadora desse organismo, tendo sido proposta a “Candidata à Lista dos Contaminantes” nos Estados Unidos por esta agência (EPA, 1998; Merino et al., 1995).

Introdução

Relativamente ao perfil de resistência da *A. hydrophila*, foi detetado no seu genoma a presença de genes que codificam β -lactamases, nomeadamente CphA, CepS e AmpS, entre outras proteínas que podem conferir resistência a antibióticos (Massidda et al., 1991; Parra-Lopez et al., 1993; Walsh et al., 1995a). O mecanismo associado às β -lactamases cromossómicas é o mais relevante na resistência a antibióticos β -lactâmicos para a maioria das *Aeromonas* (Janda and Abbott, 2010; Zhiyong, 2002).

Estipes do género *Aeromonas* são inerentemente resistentes à ampicilina, com algumas exceções como por exemplo *A. trota* (Janda and Abbott, 2010; Saavedra et al., 2004). Em geral, espécies de *Aeromonas* apresentam maiores taxas de resistência às penicilinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração (espectro estreito), e por outro lado são mais suscetíveis a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (espectro alargado) e carbapenemos, tendo em conta apenas antibióticos β -lactâmicos (Henriques et al., 2006b; Kampf et al., 1999; Palu et al., 2006; Vila et al., 2003). Relativamente à *A. hydrophila* (análise de isolados clínicos) em particular e tendo em conta os antibióticos em estudo, o perfil de resistência desta bactéria de acordo com Vila (Vila et al., 2002) é 100% resistente ao antibiótico ampicilina (resistente), 100% suscetível à cefotaxima (sensível) e 100% suscetível ao imipenemo (sensível) (Janda and Abbott, 1999; Overman and Janda, 1999; Vila et al., 2002).

2. Resistência bacteriana a antibióticos β -lactâmicos

2.1 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos constituem o grupo de agentes antibacterianos mais prescritos para o tratamento de infeções bacterianas (Li et al., 2009). A sua elevada eficácia terapêutica e baixa toxicidade justificam o seu amplo desenvolvimento e o facto de representarem os agentes antibacterianos mais usados no tratamento de infeções causadas tanto por microrganismos Gram-positivos como por microrganismos Gram-negativos (Crowder et al., 2006; Igbinosa and Okoh, 2012; Kotra and Mobashery, 1999; Li et al., 2007b). Estes agentes antibacterianos representam mais de 65% do mercado mundial de comercialização de antibióticos, com mais de 50 medicamentos comercializados (Poole, 2004). Foram descritas mais de 40 moléculas de antibióticos β -lactâmicos, estruturalmente diferentes e muitas delas são utilizadas para fins terapêuticos (Therrien and Levesque, 2000).

A penicilina G (benzilpenicilina) foi o primeiro antibiótico β -lactâmico caracterizado e introduzido na prática clínica para o tratamento de doenças infecciosas. Em 1928 Alexander Fleming, um bacteriologista escocês, constatou que um fungo pertencente ao gênero *Penicillium* produzia esta substância antibacteriana, responsável pela lise de colônias de *Staphylococcus*. Esta observação foi uma reminiscência do que Fleming tinha visto anteriormente na sua experiência com a lisozima (Derderian, 2007; Flemming, 1929; Kong et al., 2010).

Nesse mesmo ano, Fleming, juntamente com os seus assistentes Dr. Stuart Craddock e Sr. Frederick Ridley, partiu para a tentativa de purificação do agente lítico, que ele apelidou de "penicilina" (Hare, 1982). Ao longo do seu estudo, Fleming aplicou a penicilina diretamente a tecidos de origem animal, especificamente, a feridas e a olhos humanos, e verificou que esta substância não era tóxica nem irritante (Flemming, 1929). Estas experiências lendárias formaram a base para a posterior purificação da penicilina. No entanto, Fleming não estendeu o seu trabalho para estudos clínicos, uma vez que, ele não foi capaz de purificar penicilina suficiente para concluir os seus estudos. Assim, enquanto que a descoberta foi feita em 1929, a utilização de penicilina como um agente terapêutico para tratar infeções apenas se deu em 1940 por Ernest Chain e colaboradores (Chain, 1940). Estes por sua vez demonstraram a elevada eficiência da penicilina no tratamento de uma infeção causada por bactérias do gênero *Streptococcus* em ratos. Pouco tempo depois a penicilina era utilizada como agente antimicrobiano em humanos, com resultados surpreendentes (Derderian, 2007; Flemming, 1929; Kong et al., 2010).

Nos anos 50 o grupo dos β -lactâmicos compreendia apenas dois compostos: a penicilina G e a penicilina V (Rolinson, 1998). No início dos anos 60 este grupo de antibióticos foi objeto de diversos estudos. Com base no sucesso clínico sem precedentes desta enorme descoberta que foi a penicilina, mais estudos foram realizados desde então (Rolinson, 1998). Atualmente, esta classe de antibióticos está dividida em vários grupos nomeadamente, penicilinas e seus derivados, monobactâmicos, cefalosporinas da primeira à quinta geração e carbapenemos (Fig. 1) (Babic et al., 2006; Poole, 2004; Rolinson, 1998; van Hoek et al., 2011).

Introdução

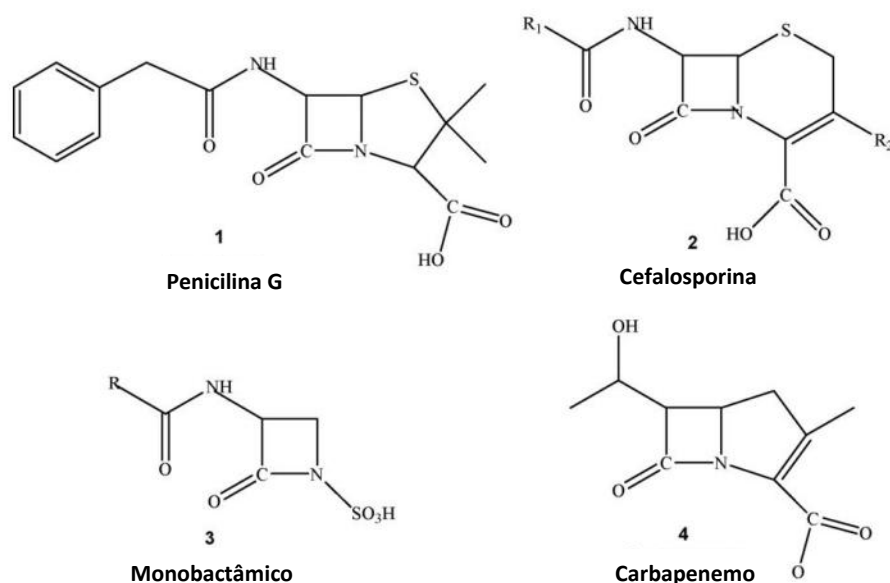


Fig. 1 – Estruturas químicas de antibióticos β -lactâmicos. Adaptado de (Babic et al., 2006).

Os antibióticos β -lactâmicos são denominados desta forma, na medida em que apresentam como estrutura comum, um anel β -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de azoto, com radicais substituintes (Babic et al., 2006; Poole, 2004; Sousa, 2006).

Em termos de classificação é comum subdividir o grupo dos β -lactâmicos em famílias que incluem substâncias com grandes afinidades estruturais. Nas penicilinas o anel β -lactâmico encontra-se unido com um anel tiazolidina, enquanto que nas cefalosporinas encontra-se fundido com um anel di-hidrotiazina. Os monobactâmicos (aztreonamo) têm a particularidade de apresentar na sua estrutura monocíclica um grupo 2-oxoazetidina-1-sulfário, apresentando no entanto uma grande analogia com a ceftazidima. Por fim, os carbapenemos possuem um átomo de carbono em substituição do átomo de enxofre no anel tiazolidina, anel anexo ao anel β -lactâmico, e uma dupla ligação em vez de uma ligação simples (Nicolau, 2008; Sousa, 2006).

2.2 Modo de ação dos antibióticos β -lactâmicos

A atividade dos antibióticos β -lactâmicos depende da sua capacidade de difusão através da membrana celular bacteriana, da afinidade do antibiótico para as enzimas alvo designadas por proteínas de ligação à penicilina (PBPs – *Penicillin binding proteins*) e da estabilidade do antibiótico face à hidrólise mediada por enzimas bacterianas

(Sousa, 2006). O mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos consiste na inibição da biossíntese da parede celular bacteriana, nomeadamente da matriz de peptidoglicano. A síntese de peptidoglicano é mediada por PBPs, que constituem o alvo principal para estes antibióticos. Essencialmente, as PBPs possuem atividade de carboxipeptidase e de transpeptidase, e estão envolvidas em vários passos do processo de construção, manutenção e regulação da matriz de peptidoglicano. A alteração covalente das PBPs é o passo crítico que altera a sua função biológica, nomeadamente durante a etapa final da biossíntese de peptidoglicano, durante a qual ocorrem reações de "cross-linking" (ligações entre cadeias peptídicas vizinhas do peptidoglicano em crescimento) que asseguram a rigidez da parede celular bacteriana, essencial para a sobrevivência da célula. Os antibióticos β -lactâmicos inibem irreversivelmente as PBPs, impedindo estas ligações (Babic et al., 2006; Sousa, 2006). Estudos efetuados por Tipper e Strominger sugeriram que a estrutura central de um antibiótico β -lactâmico, como por exemplo a penicilina, é semelhante à porção terminal acil-D-Ala-D-Ala do peptidoglicano bacteriano. Assim, as PBPs reconhecem e ligam-se às moléculas de penicilina ou de outros antibióticos β -lactâmicos, confundindo-as com o seu substrato natural (Tipper and Strominger, 1965). A estrutura e composição da molécula de peptidoglicano apresentam determinados aspetos que são específicos de bactérias, o que contribui para a elevada especificidade dos antibióticos β -lactâmicos (Rasmussen and Bush, 1997).

A eficácia dos antibióticos β -lactâmicos é constantemente desafiada pela emergência de estirpes bacterianas resistentes.

2.3 Mecanismos de resistência a antibióticos β -lactâmicos

A resistência bacteriana está intimamente associada com a utilização de agentes antimicrobianos na prática clínica. O uso excessivo de antibióticos na medicina humana, na medicina veterinária, em sistemas de aquacultura e na agricultura tem contribuído para o aparecimento e disseminação de microrganismos multirresistentes (French, 2005; Henriques et al., 2006a). A terapia prolongada com antibióticos pode levar ao desenvolvimento de resistência de um microrganismo que inicialmente é sensível aos antibióticos, mas mais tarde pode adaptar-se de forma gradual e desenvolver resistência aos mesmos. Quando uma bactéria é sujeita a uma determinada concentração de um antibiótico, as células bacterianas suscetíveis a este irão morrer, mas aquelas que têm

Introdução

alguma insensibilidade irão sobreviver. O surgimento de um fenótipo de resistência a antimicrobianos depende de vários fatores tais como: do grau de expressão de resistência, da capacidade de um microrganismo tolerar um mecanismo de resistência, da colonização inicial, entre outros fatores (Giedraitiene et al., 2011).

Apesar do progresso científico verificado na área dos antibióticos, nos últimos anos, a emergência de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos β -lactâmicos em ambientes clínicos, bem como, a existência de novos mecanismos de resistência, tem-se tornado num problema mundial. Além disso, os genes que codificam para a resistência a este grupo de antibióticos têm sido também encontrados em estirpes bacterianas ambientais (Giedraitiene et al., 2011; Henriques et al., 2006b).

A resistência bacteriana ocorre devido a características codificadas geneticamente, podendo ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca resulta da genética natural dos microrganismos. A resistência adquirida resulta de alterações na estrutura e na fisiologia celular, causadas por mudanças na genética normal do microrganismo. Estas alterações podem ocorrer devido a mutações genéticas, aquisição de genes exógenos em plasmídeos (conjugação ou transformação), em transposões (conjugação), em integrões ou ainda em bacteriófagos (transdução), ou pela associação de diferentes mecanismos (Giedraitiene et al., 2011).

Atualmente estão descritos quatro mecanismos de resistência a antibióticos β -lactâmicos: hidrólise enzimática mediada por β -lactamases, alteração das proteínas bacterianas que constituem o alvo da ação antimicrobiana (PBPs), alteração da permeabilidade da membrana e desenvolvimento de sistemas eficazes de efluxo. A hidrólise do anel β -lactâmico por enzimas específicas (β -lactamases) constitui o mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos mais comum e eficiente (Babic et al., 2006; Giedraitiene et al., 2011; Sousa, 2006).

2.3.1 Alteração das proteínas bacterianas alvo (PBPs)

As proteínas de ligação à penicilina (PBPs) são carboxipeptidases localizadas na membrana citoplasmática das bactérias que catalisam as reações de polimerização do peptidoglicano durante a biosíntese da parede celular bacteriana (Macheboeuf et al., 2006; Yamada et al., 2008). Os antibióticos β -lactâmicos inibem a síntese da parede celular. A sobreexpressão de PBPs é um dos mecanismos de resistência a estes

antibióticos. No entanto, a alteração da estrutura das PBPs ao nível do seu local catalítico afeta também a função normal destas enzimas. Por esta razão, este mecanismo de resistência é pouco frequente, especialmente em microrganismos Gram-negativos (Kotra and Mobashery, 1999). Alguns estudos mostraram que a presença de mutações nos genes produtores de PBPs, recombinações homólogas entre genes de PBPs, ou a inserção de novos genes que codificam para PBPs sem afinidade para os β -lactâmicos, resulta no aumento de resistência de determinadas bactérias a alguns destes antibióticos (Giedraitiene et al., 2011; Sousa, 2006).

2.3.2 Alteração da permeabilidade da membrana

A parede celular das bactérias pode, por si só, ser uma barreira de permeabilidade aos antibióticos, levando à resistência intrínseca de muitos microrganismos. As bactérias Gram-negativas são responsáveis por uma grande percentagem de infeções bacterianas multirresistentes. Estas bactérias possuem na membrana externa canais de proteínas, denominados porinas, que estão envolvidas no influxo de diversos compostos nomeadamente nutrientes e outras substâncias incluindo antibióticos de diversas classes (Nikaido, 1994; Pages et al., 2008).

A difusão dos antibióticos β -lactâmicos pode ser limitada pela estrutura da molécula do antibiótico ou pela sua carga. Estes antibióticos são moléculas hidrofóbicas, que têm de atravessar a membrana exterior das bactérias Gram-negativas para atingirem as PBPs. A difusão destes antibióticos para o espaço periplasmático efetua-se devido à existência dos canais de porinas (Nicolau, 2008).

O aumento da resistência bacteriana aos β -lactâmicos, está muitas vezes relacionado com a alteração da permeabilidade da membrana externa, por ausência ou diminuição da expressão de genes que codificam as porinas, causando a redução da entrada do antibiótico na célula, diminuído assim a concentração interna do antibiótico (Nikaido, 2003; Quale et al., 2006). Este mecanismo de resistência acarreta, frequentemente, resistências múltiplas, visto que diferentes antibióticos são transportados para o interior da célula bacteriana pelos mesmos canais de porinas. Este tipo de mecanismo de resistência é comum, por exemplo, em estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*. Os microrganismos incluídos nesta espécie possuem um reduzido número de porinas na membrana externa sendo, por esta razão, intrinsecamente resistentes a

Introdução

muitos antibióticos. Como a membrana externa (OM) da *P. aeruginosa* não tem as porinas clássicas (possui porinas monoméricas em vez de triméricas), os canais de porinas específicos têm um papel importante na entrada de nutrientes. Os carbapenemos também atravessam a OM através dos canais específicos (OprD). Logo, uma modificação da expressão de OprD2 (canal de imipenemo) ou a sua ausência, facto que ocorre em algumas estirpes justificam a sua resistência aos carbapenemos (Nikaido, 1994; Sousa, 2006).

Este tipo de mecanismo não é, normalmente, responsável por elevados níveis de resistência, dado que, apesar da reduzida permeabilidade, parte das moléculas de antibiótico conseguem atingir o espaço periplásmico. Elevados níveis de resistência verificam-se em isolados em que ocorre a combinação de dois tipos de mecanismos, nomeadamente a redução da permeabilidade da membrana e a produção de β -lactamases (Martinez-Martinez et al., 1999).

2.3.3 Desenvolvimento de sistemas eficazes de efluxo

Os sistemas de transporte ativo, que permitem o rápido efluxo das moléculas de antibiótico, e que por isso levam à redução da concentração dos agentes antimicrobianos no interior da célula bacteriana, constituem um mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, eficaz em algumas estirpes bacterianas. As proteínas envolvidas nos sistemas de efluxo estão normalmente localizadas na membrana citoplasmática (Giske et al., 2008; Nikaido, 1994; Wilke et al., 2005).

Geralmente a estrutura deste tipo de sistemas em bactérias Gram-negativas apresenta uma maior complexidade, devido à existência de uma segunda barreira constituída pela membrana externa. Proteínas associadas às proteínas da membrana citoplasmática fazem o transporte das moléculas de antibiótico através do espaço periplásmico e da membrana externa. Neste grupo de bactérias este mecanismo de resistência aparece muitas vezes associado a modificações na permeabilidade da membrana, sendo que ambos os mecanismos são responsáveis pela resistência intrínseca das bactérias Gram-negativas a vários antibióticos (Nakae et al., 1999; Nikaido, 1994).

Os genes que codificam os sistemas de efluxo fazem parte do genoma bacteriano e, portanto, fornecem ao microrganismo o potencial intrínseco para desenvolver um

fenótipo de resistência aos antibióticos sem a aquisição de novos genes (Wright, 2007) 2007). A atividade de alguns sistemas de efluxo pode ser induzida pela exposição ao antibiótico, de modo que uma estirpe aparentemente suscetível a um antibiótico pode tornar-se resistente (Piddock, 2006; Poole, 2005).

Outros autores referem que a presença de bombas de efluxo podem atuar associadas com outros mecanismos de resistência, para aumentar o nível e a amplitude do espectro de resistência aos agentes antimicrobianos, como por exemplo associados à produção de β -lactamases (Van Bambeke et al., 2003).

2.3.4 Hidrólise enzimática mediada por β -lactamases

Um dos principais mecanismos de resistência dos antibióticos β -lactâmicos, particularmente entre bactérias Gram-negativas, é a produção de β -lactamases. Até à data, foram descritas cerca de 300 β -lactamases (Giedraitiene et al., 2011; Tayler et al., 2010). As β -lactamases são plasmídicas ou cromossômicas, consoante a localização dos genes estruturais que as codificam. As enzimas codificadas por estes genes catalisam a hidrólise irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico dos antibióticos, dando origem a produtos biologicamente inativos, diminuindo assim o seu potencial terapêutico. Curiosamente, as β -lactamases são estruturalmente relacionadas com PBP_s (Massova and Mobashery, 1998) e podem ter evoluído a partir destas enzimas de ligação a β -lactâmicos da biossíntese da parede celular (Livermore, 1995; Majiduddin et al., 2002). A primeira β -lactamase foi descrita em 1940 por Abraham e Chain em *E.coli*, antes da utilização terapêutica da penicilina (Chain, 1940). As β -lactamases são produzidas por bactérias Gram-positivas sendo excretadas para o meio ambiente e por bactérias Gram-negativas ficando retidas no periplasma (Crowder et al., 2006; Poole, 2004; Sousa, 2006).

Em bactérias Gram-negativas, as β -lactamases podem ser transferidas livremente entre espécies, com níveis elevados de produção de enzimas cataliticamente eficientes. Muitas vezes, uma pequena alteração no promotor do gene que codifica para uma β -lactamase pode resultar num aumento de resistência por superprodução da enzima; em consequência, β -lactamases com baixa atividade catalítica podem tornar-se sérias ameaças à aplicação de antibióticos β -lactâmicos para o tratamento de infeções bacterianas (Bush, 1999).

Introdução

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos compostos β -lactâmicos ocorreu essencialmente pela necessidade de ultrapassar o desafio que as estirpes produtoras de β -lactamases representam (Demain and Elander, 1999).

As β -lactamases, dependendo da sua especificidade, são muitas vezes chamadas penicilinases, cefalosporinas e carbapenemases. Como referido, estas enzimas são os principais determinantes da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos e o seu efeito é normalmente potenciado por associação com outros mecanismos de resistência descritos anteriormente (Sousa, 2006).

2.3.4.1 Classificação de β -lactamases

Devido à diversidade de características enzimáticas das muitas β -lactamases descobertas, várias tentativas foram feitas para categorizá-los desde 1960. Estas classificações envolvem duas abordagens principais: a primeira, e mais antiga abordagem é baseada nas características bioquímicas e funcionais da enzima, ao passo que a segunda abordagem baseia-se na estrutura molecular da enzima (Igbinosa and Okoh, 2012; Kong et al., 2010). A 1ª classificação foi proposta por Jack e Richmond (1970), alargada por Richmond e Sykes (1973) e atualizada por Sykes e Matthew (1976) com a inclusão do ponto isoelétrico das β -lactamases (Sousa, 2006).

A classificação molecular de β -lactamases é baseada nas sequências de nucleótidos e de aminoácidos destas enzimas e foi proposta em 1980 por Ambler. Esta classificação agrupa estas enzimas em quatro classes designadas de A a D (figura 2). Às classes A (penicilinases), C (cefalosporinas – β -lactamases cromossómicas), e D (oxacilinases) pertencem todas as enzimas que apresentam serina no seu centro ativo. A classe B (metalo- β -lactamases) engloba enzimas que possuem um átomo de zinco no seu centro ativo, em vez de serina (Babic et al., 2006; Kong et al., 2010; Poole, 2004; Simona et al., 2009; Sousa, 2006).

Com o aparecimento de novas β -lactamases e com a disponibilidade de mais dados bioquímicos, em 1995 Bush, Jacob e Medeiros propuseram uma classificação que relacionava o perfil do substrato e dos inibidores com a sua estrutura molecular, agrupando as β -lactamases em quatro grupos funcionais (1, 2, 3 e 4) (Bush et al., 1995; Sousa, 2006). Neste sistema as β -lactamases são divididas, num passo inicial, de acordo com a sua inibição pelo agente quelante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), e

seguidamente de acordo com o perfil de substratos hidrolisados. Assim, as β -lactamases são classificadas em quatro grupos principais. O grupo funcional 1 (classe molecular C) inclui enzimas que não são inibidas pelo EDTA e hidrolisam preferencialmente a cefaloridina, sendo assim designadas por cefalosporinas. O grupo funcional 2 (classes A e D de Ambler) engloba enzimas que não são inibidas pelo EDTA, mas sim pelos inibidores de β -lactamases, nomeadamente o ácido clavulânico, o tazobactam e o sulbactam, e que hidrolisam preferencialmente a benzilpenicilina, denominadas por penicilinas. Inclui também β -lactamases de espectro alargado. O grupo 3 (classe molecular B) inclui β -lactamases que são inibidas pelo EDTA, mas não por inibidores de β -lactamases, e que hidrolisam carbapenemos, sendo por isso designadas por carbapenemases. No grupo 4 são incluídas enzimas não inibidas pelo EDTA, mas que não se adequam a nenhuma das categorias anteriores (Bush et al., 1995; Sousa, 2006).

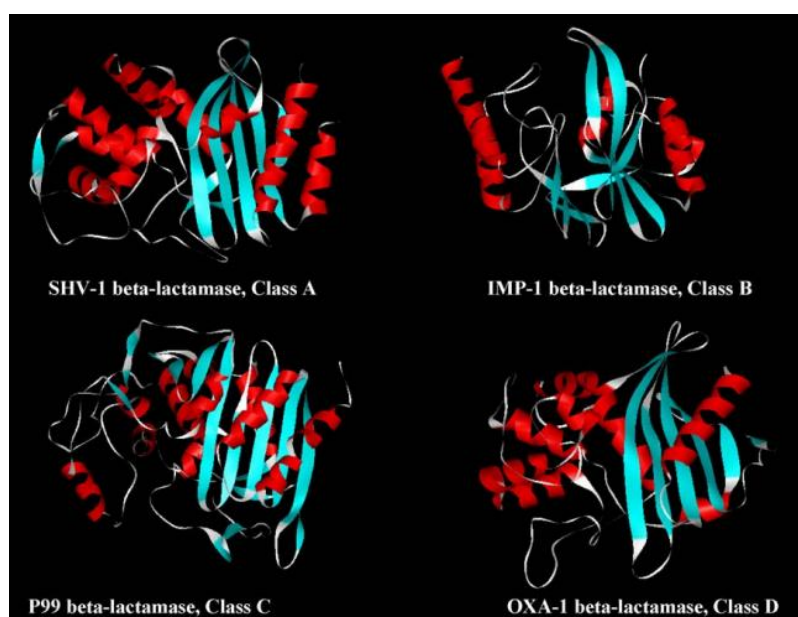


Fig. 2 – Estrutura das β -lactamases nas suas respetivas classes. Estão representadas as β -lactamases SHV-1, IMP-1, P99 e OXA-1. Adaptado de (Babic et al., 2006).

2.3.4.2 β -lactamases no género *Aeromonas*

Alguns membros do género *Aeromonas*, particularmente *A. hydrophila*, *A. veronii* e *A. caviae*, são reconhecidos como agentes causadores de gastroenterites em seres humanos e de infeções em hospedeiros imuno-comprometidos, que podem evoluir para septicemia, como já foi referido anteriormente.

Introdução

A resistência a antibióticos nestes organismos, particularmente a β -lactâmicos levanta um problema potencial no tratamento destas doenças, especialmente quando se lida com estas espécies (Walsh et al., 1997). As *Aeromonas* são intrinsecamente resistentes a vários β -lactâmicos, tais como penicilinas e cefalosporinas de primeira geração (Barillo et al., 1996). Os antibióticos de escolha para o tratamento de infeções causadas por este género são usualmente cefalosporinas de terceira geração, monobactâmicos e carbapenemos (Barillo et al., 1996). No entanto muitas estirpes de *Aeromonas* foram caracterizadas como sendo capazes de produzir até três diferentes β -lactamases, incluindo uma penicilinase classe D correspondente ao grupo 2d da classificação de Bush, uma cefalosporinase classe C, do grupo 1 e uma metalo- β -lactamase classe B, do grupo 3 (Sanchez-Cespedes et al., 2009; Tsai et al., 2006; Walsh et al., 1995b).

Entre os diferentes tipos de β -lactamases encontradas em *Aeromonas*, as enzimas de classe B (metalo- β -lactamases) são particularmente interessantes do ponto de vista clínico devido à sua capacidade para hidrolisar os compostos de carbapenemos (antibióticos de largo espectro não hidrolisados pela maioria das outras β -lactamases), como imipenemo. Dados recentes indicam que estas metalo- β -lactamase são 98% idênticas a *cphA*, uma β -lactamase encontrada em *A. hydrophila* (Hernandez Valladares et al., 2000; Walsh et al., 1997).

Sabe-se que as *Aeromonas* spp. estão entre os poucos microrganismos que possuem, a nível cromossomal, diferentes genes que codificam para diferentes β -lactamases, que lhes vão conferir resistência a antibióticos β -lactâmicos. Estas β -lactamases vão hidrolisar o anel β -lactâmico dos antibióticos, diminuindo o seu potencial terapêutico, como já foi referido anteriormente. Estes genes incluem *cphA* (também designado *imiH*), *cepH* e *ampH*, corresponde às classes B, C e D das β -lactamases, respetivamente (Avison et al., 2004; Balsalobre et al., 2009). Por exemplo, a sobreexpressão destes genes (*cphA*, *cepH* e *ampH*) tem sido associada à resistência, a carbapenemos como o imipenemo, a cefalosporinas como a cefotaxima e a penicilinas respetivamente (Iaconis and Sanders, 1990; Ko et al., 1998).

3. Genes de resistência a antibióticos β -lactâmicos

Estudos recentes demonstraram que vários genes têm expressão aumentada quando são usadas concentrações de antibióticos iguais ou perto da concentração mínima inibitória (MIC) (Brazas and Hancock, 2005; Cirz et al., 2006; Linares et al., 2006). Tem sido sugerido que alguns desses genes estão envolvidos na inibição, outros estão envolvidos com a indução de vias de *stress* celular, e alguns estão envolvidos com as medidas defensivas que o microorganismo usa para resistir aos antibióticos. Nesta visão de ação antibiótica, parece provável que muitos outros genes possam estar envolvidos nas alterações de suscetibilidade bacteriana. Alguns desses determinantes genéticos podem ter relevância clínica (Breidenstein et al., 2008).

Recentemente foi descrito, por Tayler e seus colaboradores, um mecanismo que explica a expressão destas β -lactamases. Este mecanismo baseia-se num sistema de dois componentes (TCS) que regula a expressão coordenada de 3 β -lactamases cromossomais em *Aeromonas* (Tayler et al., 2010). Este mecanismo é composto por um regulador de resposta denominado BlrA (Alksne and Rasmussen, 1997) e por um gene que codifica para uma proteína cinase, que funciona como molécula sensora neste sistema, denominada BlrB. O sistema de dois componentes foi denominado de BlrAB e já foram detetadas evidências de que este sistema regula a expressão de β -lactamases através dos genes *amp*, *cep* e *imi* em *Aeromonas* (Niumsup et al., 2003). Na figura 3 é possível visualizar mais detalhadamente como funciona este mecanismo descrito por Tayler, numa versão em oposição ao paradigma AmpR (Tayler et al., 2010).

Tendo em conta que o sistema BlrAB regula a expressão de outros genes, para além dos genes que codificam para as três β -lactamases, (Avison et al., 2004) é admissível considerar este sistema como um mecanismo de resposta a diversos estímulos de *stress*, em vez de o considerar como um mecanismo exclusivo de regulação da expressão de β -lactamases, induzido pela presença de antibióticos (Tayler et al., 2010). Embora tenha sido identificado, o dissacarídeo-pentapeptídeo M5 (produto da degradação da unidade monomérica do peptidoglicano), como potencial ligando ativador do sistema BlrAB (Tayler et al., 2010), outros determinantes podem contribuir para o mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos. De facto, estudos recentes permitiram introduzir o conceito de resistoma (Breidenstein et al., 2008; Wright, 2007), que consiste no conjunto de todos os genes que contribuem para a resistência bacteriana. A mutação de

Introdução

cada um destes determinantes - sejam estes determinantes genéticos de resistência a antibióticos ou, simplesmente, modificadores da expressão de resistência - dará origem a um perfil de suscetibilidade alterado, como demonstrado, por exemplo, para *Pseudomonas aeruginosa* (Breidenstein et al., 2008; Schurek et al., 2008).

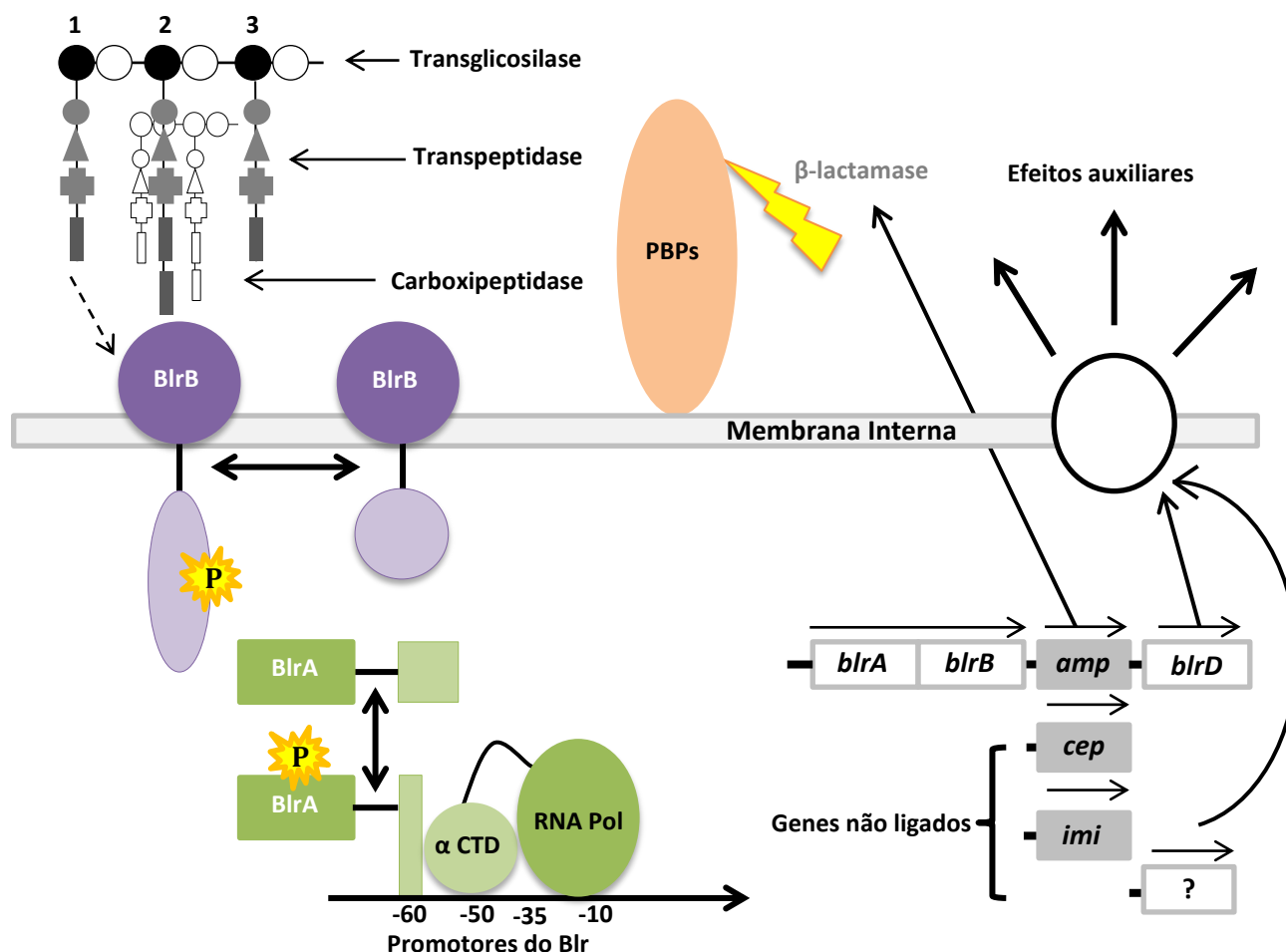


Fig. 3 – Sistema de dois componentes que regula a expressão de β-lactamases em *Aeromonas* proposto por Tayler e os seus colaboradores. A inibição das proteínas de membrana, envolvidas na síntese do peptidoglicano (PBPs), por β-lactâmicos provoca um aumento da concentração do ligando ativador de BlrB, fazendo com que ocorra a sua auto-fosforilação ('P' no esquema). Este fosfato é transferido para BlrA (regulador da resposta), que por sua vez, quando fosforilado se liga a uma sequência conservada (tag) a montante da região promotora dos 3 genes regulados pelo sistema BlrAB, favorecendo a ligação da RNA polimerase. A ativação da expressão das 3 β-lactamases leva à hidrólise dos antibióticos β-lactâmicos, prevenindo a degradação do peptidoglicano. Adaptado de (Tayler et al., 2010).

4. Formação de Biofilme e resistência a antibióticos

O biofilme bacteriano é formado quando os organismos unicelulares se unem para formar uma comunidade que se encontra ligada a uma superfície sólida. Os biofilmes podem ser formados por uma ou várias espécies de bactérias.

Estima-se que a maioria das bactérias, tanto nos seus habitats naturais como em ecossistemas aquáticos naturais, se encontra organizada em biofilmes (Donlan and Costerton, 2002). O facto das bactérias se encontrarem presentes em biofilme oferece-lhes enormes vantagens comparativamente com as que vivem planctonicamente. Primeiro, as bactérias são mantidas no microambiente selecionado onde a sobrevivência da população não depende de multiplicação rápida (Jefferson, 2004). Isto é especialmente vantajoso em ambientes em que as bactérias são expostas a movimentos e líquidos, como, por exemplo, em ambientes aquáticos. Além disso, os biofilmes oferecem melhores oportunidades para interações através da transferência horizontal de genes (Burmolle et al., 2006; Jefferson, 2004; Molin and Tolker-Nielsen, 2003).

Tem sido observado que a resistência aos antibióticos de biofilmes é aumentada em comparação com o que é normalmente observado com as células planctónicas. De facto, quando as células se encontram num biofilme, elas podem tornar-se 10-1000 vezes mais resistentes aos efeitos de 2-5 agentes antimicrobianos (Mah and O'Toole, 2001). A formação de biofilme tem uma enorme importância na clínica, uma vez que, de acordo com alguns estudos, eles diminuem a suscetibilidade aos antimicrobianos (Kaplan, 2011). Os fatores que contribuem para a resistência antimicrobiana mediada pelo biofilme incluem difusão ineficiente do agente antimicrobiano dentro da matriz do biofilme, a taxa de crescimento lenta das bactérias, a presença persistente de células resistentes a antibióticos ou pequenas colónias variantes, alterações locais do microambiente que pode prejudicar a atividade do agente antimicrobiano, e outras diferenças fenotípicas desconhecidas. Além disso, a proximidade das células dentro de um biofilme pode facilitar a troca de elementos genéticos móveis, como referido anteriormente, e deste modo aumentar a disseminação de resistência aos antibióticos (Kaplan, 2011; Mah and O'Toole, 2001; Subramanian et al., 2012).

Numerosos estudos têm mostrado que concentrações sub-inibitórias de alguns antibióticos (sub-MIC – que corresponde a uma concentração de antibiótico inferior ao

Introdução

valor de MIC), embora não sejam capazes de matar as bactérias, podem inibir a formação de biofilme. Um bom exemplo é o antibiótico azitromicina, que inibe eficazmente a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* mesmo em reduzidas concentrações (Ichimiya et al., 1996; Kaplan, 2011; Wagner et al., 2005). *P. aeruginosa* formam biofilmes nos pulmões de pacientes com fibrose quística e contribui para a lesão pulmonar e insuficiência respiratória progressiva (Hoiby, 1993). Embora a maioria dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* sejam resistentes à azitromicina (MIC > 64 µg/ml), uma terapia de baixa dose de azitromicina tem sido o suficiente para melhorar a função pulmonar em pacientes com fibrose quística. Deste modo, uma terapia com baixa dose de azitromicina não mata a bactéria mas auxilia no melhoramento do quadro clínico através da inibição da formação de biofilme (Clement et al., 2006; Wagner et al., 2005).

Contrariamente ao que foi mencionado anteriormente, numerosos estudos referem que a formação de biofilme, em alguns casos, parece também ser reforçada na presença de alguns antibióticos, quando presentes em concentrações inferiores ao valor de MIC (Elliott et al., 2010; Hoffman et al., 2005). Este é um fenómeno comum entre bactérias e pensa-se que é resultado de uma resposta global ao *stress* celular (Kaplan, 2011).

A formação de biofilme induzida por antibióticos pode ser um processo clinicamente relevante porque as bactérias são expostas a concentrações sub-inibitórias de antibiótico durante o curso normal do antibiótico, por exemplo, durante uma terapia de baixa dose (Odenholt, 2001).

Na figura 4 encontram-se representados alguns dos mecanismos que podem contribuir para a resistência de bactérias, sobrevivendo em biofilme, aos agentes antimicrobianos.

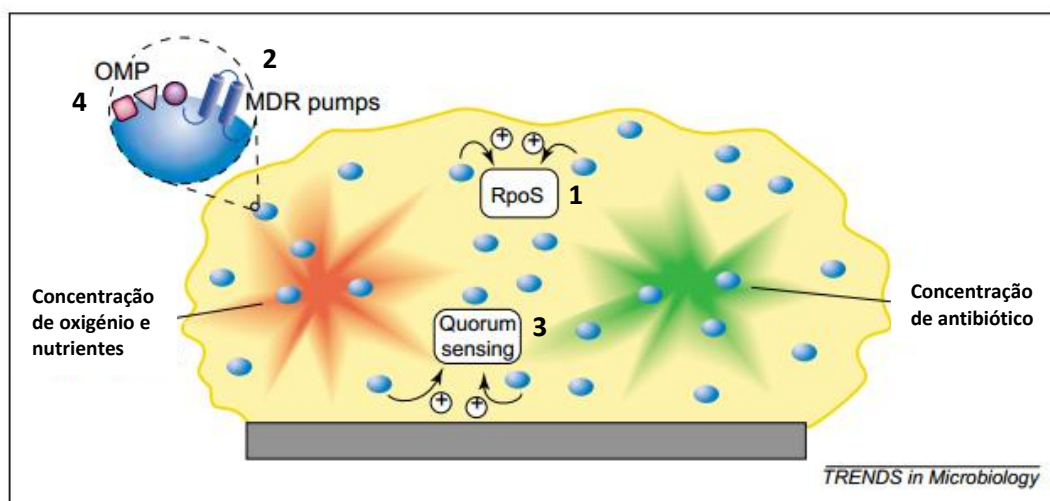


Fig. 4 – Resistência a antibióticos em biofilmes. Este esquema representa os mecanismos que podem contribuir para a resistência de bactérias, sobrevivendo em biofilme, aos agentes antimicrobianos. O polissacarídeo extracelular é representado a amarelo e as bactérias através das bolas azuis. Os biofilmes são marcados pela sua heterogeneidade e essa heterogeneidade pode incluir gradientes de nutrientes, resíduos e oxigênio (representado pelas estrelas coloridas). Mecanismos de resistência no biofilme incluem aumento da densidade celular e da exclusão física do antibiótico. As bactérias individuais num biofilme podem igualmente sofrer alterações fisiológicas que contribuem para a resistência. Vários autores especularam que as seguintes alterações podem ocorrer no biofilme: (1) indução da resposta ao *stress* (um processo dependente de RpoS em bactérias Gram-negativas), (2) bombas de aumento da expressão de resistência a múltiplos antibióticos (MDR), (3) ativação de sistemas de *quorum sensing*, e (4) alteração dos perfis de proteínas da membrana externa (OMP). Adaptado de (Mah and O'Toole, 2001).

O primeiro estudo a demonstrar que a concentração sub-inibitória de antibióticos pode induzir a formação de biofilme bacteriano *in vitro* foi publicado em 1988 por Gordon Christensen (Schadow et al., 1988). Neste estudo, uma em cada três estirpes de *Staphylococcus epidermidis* mostrou um aumento de 65% na formação de biofilmes na presença de $\frac{1}{4}$ de MIC do antibiótico rifampicina. Nenhuma das estirpes mostraram um aumento na formação de biofilmes em resposta a concentrações de $\frac{1}{4}$ de MIC de oito outros antibióticos, e a maior parte demonstrou uma diminuição. Poucos trabalhos foram publicados sobre este assunto até 2005, quando Hoffman e co-autores publicaram na revista Nature o resultado da sua investigação demonstraram que

Introdução

concentrações sub-inibitórias de tobramicina induziram a formação de biofilme em *P. aeruginosa* (Hoffman et al., 2005). Depois deste estudo foram publicados mais artigos, direcionados para a relação entre a resistência a antibióticos e a formação de biofilme noutras espécies (Ahmed et al., 2009; Bagge et al., 2004; Boehm et al., 2009; Frank et al., 2007; Mirani and Jamil, 2011; Nucleo et al., 2009), no entanto nenhum deles foi realizado para *Aeromonas*, nomeadamente para *A. hydrophila*.

Apesar de tudo, o estudo realizado por Kaplan (Kaplan, 2011) ajudou-nos a perceber que a sub-MIC de uma variedade de antibióticos quimicamente distintos com diferentes modos de ação pode induzir significativamente a formação de biofilme em diversas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas *in vitro* (Kaplan, 2011).

5. Interesse e importância

Estudos recentes têm demonstrado que a presença de *Aeromonas* spp. tanto em água como em alimentos é um potencial risco para a saúde pública, uma vez que alguns microrganismos do género *Aeromonas* produzem uma ampla gama de fatores de virulência. Deste modo, a patogenicidade das infeções associadas a estes microrganismos é considerada complexa e multifatorial (Chopra et al., 2000).

À medida que a diversidade do género *Aeromonas* foi sendo descrita, aumentou a sua importância como agente patogénico (Carson et al., 2001), nomeadamente em relação a determinadas espécies em particular, como é o caso de *A. hydrophila* (Janda and Abbott, 2010; Krzyminska et al., 2009; Martin-Carnahan, 2005).

Estudos efetuados em amostras de águas, resultantes das inundações provocadas pelo furacão Katrina, em Nova Orleans, demonstraram a presença de um elevado número de isolados de *Aeromonas* spp.. Além disso revelaram também que as *Aeromonas* eram a causa mais comum de infeções de pele e tecidos moles entre os sobreviventes do *tsunami* de 2004 no sul da Tailândia (Seshadri et al., 2006).

Alguns estudos mencionaram uma elevada taxa de mortalidade causada por infeções por estirpes de *Aeromonas* nomeadamente por *A. hydrophila* e *A. veronii* em pacientes imuno-deprimidos. Para os microbiologistas “essa alta taxa de mortalidade” é provavelmente devida à prescrição empírica de antibióticos β -lactâmicos (que em doses sub-inibitórias induzem a expressão de β -lactamases) com o consequente aumento da resistência (Tayler et al., 2010). No entanto, como referido anteriormente, não são ainda

conhecidos todos os fatores envolvidos no mecanismo de regulação da expressão de β -lactamases. O insucesso da terapia com antibióticos, com o intuito de eliminar bactérias resistentes, e a crescente tendência de multirresistência apresentada em estirpes de *Aeromonas* é outro dos problemas que resulta na “alta taxa de mortalidade” (Levy, 2005).

A presença de determinantes genéticos de virulência provavelmente implicados na patogenicidade para os humanos, e genes de resistência a antibióticos foram encontrados em isolados de *Aeromonas* resultantes de amostras água (Henriques et al., 2006b; Krovacek et al., 1994; Saavedra et al., 2004)

O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos tornou-se um problema de saúde pública, uma vez que as bactérias podem ser encontradas em diferentes locais. A resistência aos antibióticos foi classificada pela Organização Mundial de Saúde como uma das três maiores ameaças à saúde pública do século 21 (Levesque et al., 1995). A rápida emergência de resistência aos antibióticos entre as bactérias, nomeadamente em ambiente aquático é, em grande parte, devido à troca de genes de resistência por meio de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposições e integrões, que codificam a resistência a diferentes antibióticos (Balsalobre, 2010; Barreto, 2010; Wegener and Frimodt-Moller, 2000).

Por tudo isto, torna-se cada vez mais relevante o estudo do género *Aeromonas* mas especificamente de estirpe da espécie *A. hydrophila*, dado estar intimamente relacionada com infeções em humanos e a sua resistência a antibióticos β -lactâmicos é, cada vez mais, um problema de saúde pública.

6. Bibliotecas de mutantes

Recentemente, têm vindo a ser realizados estudos sistémicos, que têm como objetivo a identificação de genes que se encontram relacionados com a capacidade da célula responder e resistir à ação de antibióticos. Alguns estudos focando a resistoma intrínseco da *Pseudomonas aeruginosa* reconheceram o envolvimento de novos determinantes genéticos na resistência antimicrobiana (Breidenstein et al., 2008; Schurek et al., 2008; Wiegand et al., 2008). Estes estudos foram realizados pesquisando bibliotecas de mutantes obtidos por transposição de transposões quanto a alterações aos perfis de resistência a vários antibióticos. De acordo com Wiegand e colaboradores,

Introdução

a pesquisa de bibliotecas genómicas de resistência a múltiplos antibióticos pode ser utilizada para identificar a alteração da expressão de vários genes (Wiegand et al., 2008).

A produção de bibliotecas de mutantes por mutagénese aleatória (por transposição) é uma ferramenta útil e pretende a criação de um grande número de mutações independentes ao longo de todo o genoma de um organismo (Breidenstein et al., 2008; Schurek et al., 2008; Wiegand et al., 2008). Vale a pena referir que existe um estudo sobre a produção de quitinase em *Aeromonas caviae* (Li et al., 2007a), que tirou partido da criação de uma biblioteca de mutantes utilizando mutagénese aleatória por transposição, o que corrobora a aplicabilidade desta metodologia em *Aeromonas*; no caso presente o objetivo é o de aumentar o conhecimento sobre o resistoma deste grupo de organismos.

II. OBJETIVOS

Tendo em conta que:

- estirpes de *A. hydrophila* têm sido epidemiologicamente relacionadas com infeções humanas;
- o surgimento de resistência a antimicrobianos é um enorme problema de saúde pública devido ao atraso no tratamento das infeções, ao aumento do tempo de permanência hospitalar com aumento substancial do custo dos cuidados de saúde e ao elevado risco de resultados fatais;
- ainda ao facto de que os carbapenemos e cefalosporinas de 1ª geração são antibióticos de escolha para tratar infeções por *Aeromonas*, tendo surgido estirpes resistentes a estes antibióticos devido à sobreexpressão de genes cromossomais.

Colocando como hipótese que a sobreexpressão de β -lactamases envolve respostas metabólicas e fisiológicas complexas, envolvendo várias vias de regulação e vários genes, propomo-nos contribuir para o esclarecimento desse tipo de processos.

Assim, o objetivo principal deste estudo é identificar determinantes genéticos que possam estar envolvidos na regulação do mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos, (podendo por isso constituir novos alvos de aplicação terapêutica) através da construção e análise de uma biblioteca de mutantes de *A. hydrophila*.

Para o cumprimento deste objetivo será necessário:

- Construção de uma biblioteca de mutantes para *A. hydrophila* CECT 839;
- Caracterização da biblioteca de mutantes;
- Avaliação fenotípica dos mutantes através da determinação da suscetibilidade a antibióticos β -lactâmicos e da sua capacidade para formação de biofilme;
- Identificação do local de inserção do transposão para determinação do gene interrompido responsável pela alteração do fenótipo de resistência.

III. MATERIAL E

MÉTODOS

A estratégia aplicada para a realização deste trabalho está esquematizada na figura 5. Estão indicadas, de forma sucinta, as metodologias utilizadas para a construção de uma biblioteca de mutantes, sua caracterização e identificação/caracterização dos mutantes com alteração fenotípica de resistência a antibióticos β -lactâmicos.

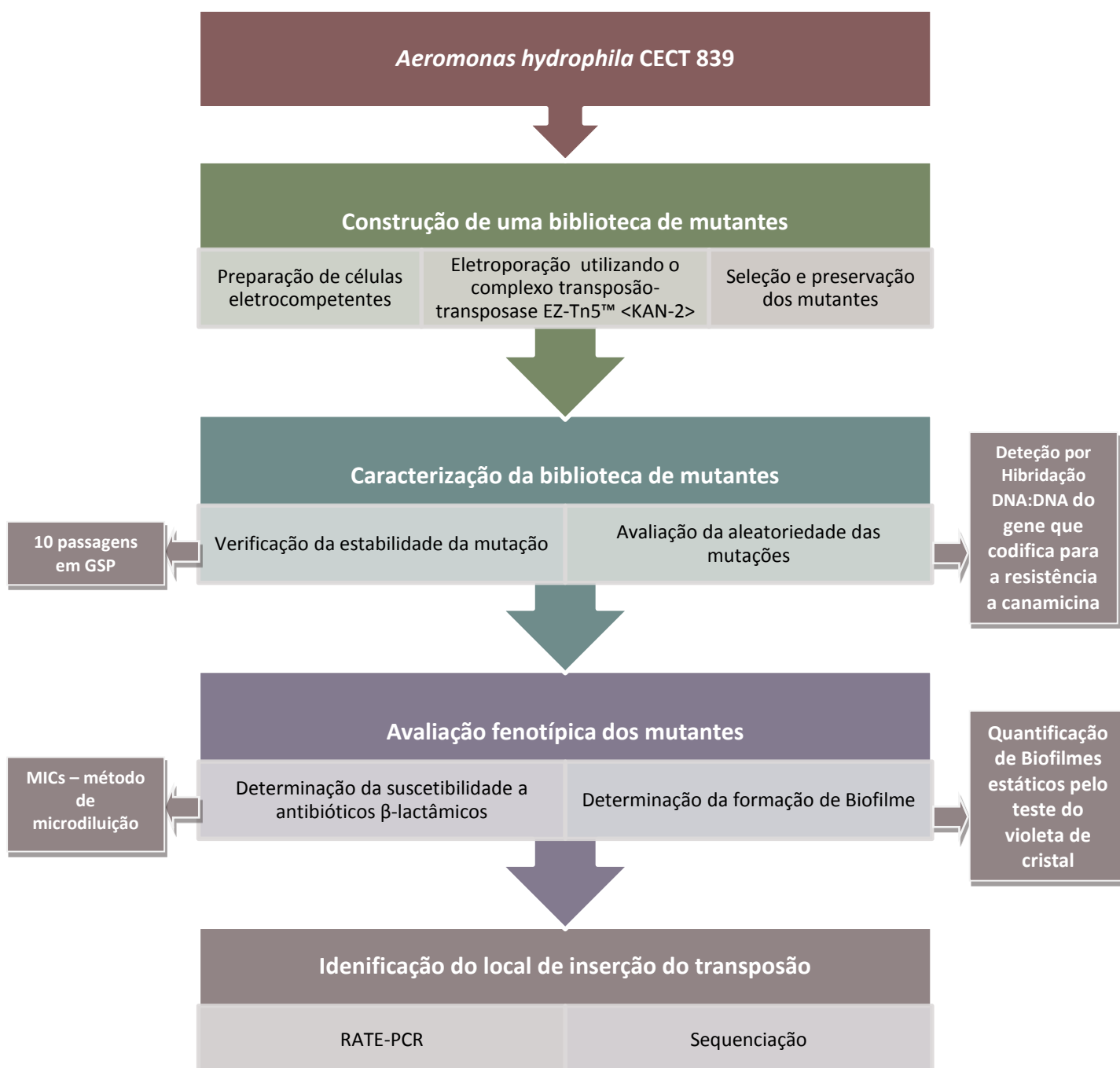


Fig. 5 – Representação esquemática das metodologias utilizadas ao longo deste trabalho.

Material e Métodos

1. Estirpe bacteriana e transposição

A estirpe bacteriana utilizada, na realização deste trabalho foi a *Aeromonas hydrophila* CECT 839 (ATCC 7966^T). Para a criação da biblioteca de mutantes foi utilizado o complexo transposição-transposase EZ-Tn5™ <KAN-2> do EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ Kit da Epicentre®.

2. Meios de cultura

Para todos os meios de cultura é dada a composição para o volume de 1L. Logo após a sua preparação e segundo as indicações do fabricante, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão durante 20 min. Sempre que necessário, meios sólidos foram preparados de acordo com a composição apresentada para o meio líquido correspondente, com o suplemento de 2 % de Agar-Agar (Merck).

Meio de “Glutamate Starch Phenol-red Agar” (GSP – Merck)

Glutamato de Sódio	10,0g	
Amido Solúvel	20,0g	
KH ₂ PO ₄	2,0g	
MgSO ₄	0,5g	
Vermelho de fenol	0,36g	
Agar-agar	12,0g	(pH 7,2)

Meio de “Luria-Bertani” (LB – Merck)

Peptona de caseína	10,0g	
Extracto de levedura	5,0g	
NaCl	10,0g	(pH 7,0)

Meio de “Mueller-Hinton-Broth” (MHB – Merck)

Infusão de carne	2,0g	
Hidrolizado de caseína	17,5g	
Amido	1,5g	(pH 7,4)

SOC

Triptona	20g	
Extracto de levedura	5g	
NaCl	10mM	
KCl	2,5mM	
Glucose	20mM	(pH 7,0)

Nota: Preparar separadamente uma solução de glicose (2 M) em água e esterilizar por filtração com um filtro de 0,20 µm (*Albert*) para suplementar o meio previamente autoclavado e arrefecido (Sambrook J., 1990).

2.1 Aditivos aos meios de cultura: antibióticos

Canamicina

O antibiótico canamicina foi preparado em alíquotas a uma concentração *stock* de 100 mg/ml em água destilada, posteriormente esterilizada por filtração e armazenada a -20 °C, para posterior utilização a 100 µg/ml em meio de cultura para seleção de mutantes.

Ampicilina, cefotaxima e imipenemo

Os antibióticos ampicilina, cefotaxima e imipenemo foram preparados a uma concentração *stock* de 5,12 mg/ml em água destilada para posterior utilização a 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml e 0,125 µg/ml. Estes antibióticos foram adicionados separadamente ao meio MHB para a determinação de MICs pelo método de microdiluição.

Após a preparação cada uma das soluções foi esterilizada por filtração, usando filtros de 0,20 µm (*Albert*). Foram distribuídas por alíquotas que foram conservadas a -20 °C.

3. Conservação e preservação dos microrganismos

A estirpe de *A. hydrophila* CECT 839 foi semeada em placas de meio GSP, e incubada a 30 °C durante 18 h. A partir de colónias isoladas, procedeu-se à amplificação da cultura

Material e Métodos

em meio líquido para posterior criopreservação (-80 °C) em meio LB contendo 20 % de glicerol.

Da mesma forma, os mutantes pertencentes à biblioteca desenvolvida foram sempre repicados em placas de GSP suplementado com antibiótico canamicina (100 µg/ml). As placas foram incubadas a 30 °C durante 18 h. Para garantir a sua total conservação também foram armazenados em meio LB com glicerol (20 %) a -80 °C. Sempre que necessário recuperou-se a estirpe retirando alíquotas deste *stock*, para placas de Petri (seladas com parafilm™) com meio GSP, posteriormente incubadas à temperatura ótima de crescimento da estirpe (30 °C), durante 14-16 h. Para sua conservação, as placas foram mantidas a 4 °C e repicadas regularmente.

O crescimento das estirpes em meio líquido, foi realizado utilizando o meio LB e com uma incubação a 30 °C durante 14-16 h, em agitador orbital (180 a 200 rpm).

4. Extração do DNA total de isolados bacterianos

O DNA total dos mutantes da estirpe *A. hydrophila* CECT 839 foi preparado a partir de culturas líquidas em meio LB, com o kit comercial *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante seguidamente descritas.

Extração de DNA de Isolados Bacterianos (Genomic DNA Purification Kit)

1. Selecionar uma colónia isolada da placa de GSP e ressuspender em 2 ml de meio de cultura LB.
2. Incubar durante 16-18 h, a 30 °C, com agitação a 200 rpm.
3. Sedimentar as células por centrifugação, durante 10 min a 13000 rpm e remover o sobrenadante.
4. Ressuspender o *pellet* em 200 µl de tampão TE e agitar vigorosamente no *vórtex*.

Tampão TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA

5. Adicionar 6 µl de solução fresca de lisozima (10 mg/ml em água) (Boehringer Mannheim) e 6 µl de proteinase K (20 mg/ml em água) (Boehringer Mannheim) e incubar 1 h a 45 °C.

-
6. Adicionar 400 µl de solução de lise (Fermentas) e incubar 10 min a 65 °C.
 7. Adicionar 600 µl de clorofórmio e agitar bem por inversão até que as duas fases se misturem.
 8. Centrifugar 10 min a 13000 rpm.
 9. Remover a fase aquosa para um novo microtubo.
 10. Adicionar 600 µl de isopropanol refrigerado. Misturar com muito cuidado e tentar visualizar o novelo de DNA que se vai formando.
 11. Colocar a 4 °C, durante 10 min (ou mais tempo).
 12. Centrifugar 10 min a 13000 rpm e descartar sobrenadante.
 13. Adicionar 100 µl de NaCl (1,2 M – Fermentas)
 14. Adicionar 2 µl de RNase (10 mg/ml) e incubar 10 min a 37 °C.
RNase (Sigma): solução *stock* preparada a 10 mg/ml em Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 15 mM. Aquecer a 100 °C durante 15 min para inativar eventuais DNases contaminantes; dividir em alíquotas e guardar a -20 °C.
 15. Adicionar 300 µl de etanol absoluto (-20 °C) e incubar a -20 °C, 10 min (ou mais tempo).
 16. Centrifugar 10 min a 13000 rpm e descartar o sobrenadante.
 17. Lavar o *pellet* com 200 µl de etanol a 70 %. Bater lateralmente para soltar o *pellet* e centrifugar 5-10 min a 13000 rpm.
 18. Descartar o sobrenadante e secar o *pellet*.
 19. Ressuspender o *pellet* em 40 µl de tampão TE.
-

5. Hidrólise de DNA por endonucleases de restrição

A enzima de restrição utilizada para as digestões do DNA genómico, dos mutantes em estudo foi a enzima *SalI* fornecida pela casa comercial Fermentas, e foi utilizada de acordo com as recomendações do fornecedor. Utilizamos a enzima *SalI*, uma vez que, esta não corta o gene de canamicina que se encontra no transposão, corta imediatamente a seguir ao gene.

As digestões do DNA extraído dos mutantes efetuaram-se em volumes totais de 10 a 50 µl contendo 0,1 a 5 µg de DNA e 1 a 5 U de enzima por µg de DNA (Sambrook J., 1990). As condições relativas ao tempo e temperatura de incubação, bem como o tampão a utilizar foram estabelecidas, como já foi referido, segundo as recomendações

Material e Métodos

do fornecedor. Em paralelo, para cada DNA, foram incubadas reações sem adição de enzima que funcionaram como controlo das reações de digestão.

6. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

As reações de PCR foram efetuadas em volumes de 25 µl e decorreram num termociclador MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad). Os reagentes, tampões, oligonucleótidos (dNTP's), MgCl₂ e *Taq* DNA polimerase (Fermentas) foram utilizados nos volumes a seguir indicados.

A amplificação do gene de canamicina permite verificar, se o transposição com a cassette de resistência à canamicina foi inserido.

PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

	Concentração em stock	Volume
H ₂ O	---	11,75 µl
MgCl ₂	25 mM	3 µl
dNTP's	2 mM	2,5 µl
Tampão 10x PCR com NH ₄ ⁺	10x	2,5 µl
<i>Primer Kan-R</i>	10 µM	1 µl
<i>Primer Kan-F</i>	10 µM	1 µl
DMSO	5 %	1,25 µl
<i>Taq</i> polimerase	1 U/µl	1 µl
DNA molde	50-100 ng	1 µl
Volume final		25 µl

O programa utilizado para a amplificação do fragmento do gene de kan^R foi:

- Desnaturação inicial de 5 min a 94 °C
- 40 ciclos de Amplificação (desnaturação a 94 °C, 40 seg; emparelhamento/"annealing" a 62 °C, 1 min; extensão a 72 °C, 2 min)
- Extensão final de 30 min a 72 °C.

Estas condições para amplificação de DNA, nomeadamente o programa utilizado e as concentrações de $MgCl_2$ e DNA, foram definidas e adaptadas de acordo com o tamanho e sequência do fragmento a amplificar e dos *primers* (anexo 1) usados para cada caso (Li et al., 2007a).

Por fim, a amplificação do gene por PCR é visualizada numa eletroforese realizada num gel de agarose de 1 % em TAE 1x.

7. Eletroforese de DNA

7.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os fragmentos de DNA foram separados em géis de agarose (Merck), por sua vez estes foram preparados a concentrações de 1 % e de 0,8 %. As eletroforeses decorreram a voltagens de 1 a 4 V/cm, em Tampão TAE 1x (Sambrook J., 1990). As amostras foram carregadas no gel após adição de 1/6 de volume de tampão de carga.

Tampão TAE 50x: 40 mM Tris Base, 40 mM Acetato, 2 mM EDTA, pH 8,0.

Tampão de carga 6x: 0,25% Bromofenol, 0,25 % Xileno Cianol, 40 % Sacarose ou 30 % Glicerol, pH 8,0.

7.2 Marcador de peso molecular de ácidos nucleicos

O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por comparação com a migração de fragmentos de peso molecular conhecido. Para tal, foi utilizado o seguinte marcador de peso molecular Gene Ruler™ DNA Ladder MIX (Fermentas) (anexo 2).

7.3 Visualização de DNA

Os géis de agarose foram corados numa solução de brometo de etídio (EtBr) a 5µg/ml, durante cerca de 20 min. O excesso de brometo foi removido por lavagem com água destilada durante aproximadamente 5 min. Após a coloração, o DNA foi visualizado num transiluminador de luz UV sendo digitalizado num Gel Doc™ XR⁺ with Image Lab™ Software (Bio-Rad).

8. Purificação de produtos de PCR

Os produtos de PCR selecionados para posterior determinação da sua sequência nucleotídica foram purificados com o *kit PCR Product Purification Spin Kit 250* (Jetquick) e o protocolo sugerido pelo fabricante encontra-se descrito em seguida.

PCR Product Purification Spin Kit 250 (Jetquick)

1. Num microtubo de 1,5 ml colocar 400 µl de H1 (Binding Solution – Gibco BRL) e o produto de PCR a purificar e homogeneizar.
 2. Numa coluna (Gibco BRL), com um tubo de 2 ml, colocar a preparação anterior e centrifugar 1 min à velocidade máxima.
 3. Descartar o sobrenadante que ficou no tubo.
 4. Adicionar 500 µl de H2 (Wash Buffer – Gibco BRL) e centrifugar 1 min à velocidade máxima e descartar o sobrenadante.
 5. Centrifugar novamente nas mesmas condições para remover restos de tampão H2.
 6. Colocar a coluna num microtubo de 1,5 ml estéril.
 7. Colocar 30 µl de água previamente aquecida a 65 °C, em cima da membrana e deixar repousar 1 min.
 8. Centrifugar 2 min à velocidade máxima para recolher a o produto purificado.
-

Uma vez purificados, os produtos de PCR foram sequenciados com os primers apropriados pela GATC Biotech AG Laborteam (Konstanz, Germany) ou pela StabVida (Oeiras, Portugal).

9. Transferência de fragmentos de DNA separados em gel de agarose para membranas de nylon

Os fragmentos de DNA digerido, que foram separados por electroforese foram transferidos para uma membrana de nylon, utilizando um sistema de vácuo (VacuGene XL, Pharmacia Biotech). O procedimento utilizado foi estabelecido e adaptado, tendo como base o protocolo fornecido pela casa comercial, de modo a otimizar a eficiência do sistema.

Vacuum Blotting

1. Incubar o gel com solução despurinizante, com agitação suave durante 10 min.
O volume de solução adicionada deve ser suficiente para manter o gel submerso.
Solução despurinizante: NaOH 0,25 N
2. Descartar a solução anterior e adicionar aproximadamente o mesmo volume de solução desnaturalizante. Manter durante 45 min com agitação suave.
Solução desnaturalizante: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M
3. Retirar a solução anterior e deitar sobre o gel o mesmo volume de solução neutralizante. Manter durante 30 min com agitação suave.
Solução neutralizante: NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1 M; EDTA 1 mM (pH 7,2-7,5)
4. Cortar uma membrana de *nylon* (Amersham Hybond™ - N⁺) cujas dimensões sejam superiores em 1 cm às do gel. Humedecer a membrana com SSC 2x.
5. Colocar a membrana na unidade de transferência e efetuar a montagem do sistema de acordo com as instruções do fabricante.
6. Colocar o gel suavemente sobre a membrana, tendo o cuidado de evitar que se formem bolhas de ar entre o gel e a membrana.
7. Com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*, deitar sobre o gel a solução de transferência (SSC 20x).
SSC 20x: NaCl 3 M; Citrato de sódio 0,3 M (pH 7,0)
8. Transferir durante 60 min a 50 mBar nunca deixando que o gel seque. Retirar todo o líquido; remover o gel e, finalmente, a membrana.
9. Fixar durante 5 min num transiluminador sob radiação UV.

10. Detecção de sequências homólogas por hibridação DNA-DNA

As técnicas descritas neste ponto foram efetuadas utilizando o Sistema comercial DIG de Marcação e Detecção não-radioativa de Ácidos Nucleicos (DIG DNA Labeling and Detection Starter Kit I e DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche Molecular Biochemicals).

Estas técnicas foram realizadas de acordo com as indicações do fornecedor e outras adaptações, tendo em conta o que foi descrito anteriormente por Moura et al. (Moura et al., 2007).

Material e Métodos

10.1 Marcação não radioativa de sondas de DNA

A técnica de marcação não radioativa de sondas de DNA foi realizada por marcação *random primed* e marcação por PCR. Este método baseia-se na incorporação de nucleótidos marcados com uma molécula designada digoxigenina-11-dUTP (DIG-dUTP) durante a síntese de novas cadeias de DNA. A técnica utilizada apresenta várias vantagens na medida em que, apresenta uma tecnologia segura, as sondas de DNA podem ser guardadas pelo menos um ano a -20 °C, sem perda de atividade e as soluções de hibridação podem ser reutilizadas várias vezes.

10.1.1 Método *random primed*

O método *random primed DNA labeling* consiste na incorporação de uma mistura de hexanucleótidos, para marcação de fragmentos de DNA obtidos por digestão com enzimas de restrição, seguida da extensão de oligonucleótidos iniciadores pelo fragmento *Klenow* da DNA polimerase I.

O objetivo deste método é produzir uma quantidade suficiente de sonda marcada, no menor período de tempo, sendo o rendimento da reação de marcação proporcional ao período de duração da mesma. Através deste método é possível marcar entre 10 ng – 3 µg de DNA molde.

DIG DNA labeling and detection kit (cat nº: 1093657, Roche)

1. Num microtubo, adicionar 14 µl de dH₂O estéril e 1 µl de DNA (marcador de peso molecular Gene Ruler™ DNA Ladder MIX (Fermentas)).
2. Desnaturar o DNA fervendo 10 min numa panela. Arrefecer em gelo rapidamente.
3. Ao microtubo anterior, adicionar 2 µl de *hexanucleotide mix* 10x (vial5).
4. Posteriormente adicionar 2 µl de *dNTP labelling mix* (vial6).
5. Por fim adicionar 1 µl de enzima *Klenow* (vial7).
6. Homogeneizar cuidadosamente e centrifugar alguns segundos.
7. Incubar a 37 °C, 16 h.
8. Parar a reação aquecendo a 65 °C, 10 min.

-
9. Retirar do banho e reservar a -20 °C até adição à sonda de hibridação.
 10. Para adição do marcador à sonda de hibridação, deixar descongelar em gelo e pipetar 1 µl para 19 µl de dH₂O.
 11. Ferver numa panela durante 15 min.
 12. Adicionar à solução de hibridação.
-

10.1.2 Incorporação de digoxigenina-11-dUTP por PCR

A marcação de fragmentos de DNA baseia-se numa técnica de PCR, que permite obter grandes quantidades de sonda marcada, através da incorporação de DIG-11-dUTP pela enzima *Taq* DNA polimerase. Tanto a reação de PCR, como o programa a ser utilizado são iguais ao que foi descrito anteriormente no ponto 6 deste capítulo, com exceção dos nucleótidos a adicionar (Li et al., 2007a). Estes nucleótidos foram substituídos nas reações de marcação por PCR DIG Labeling Mix (Roche Molecular Biochemicals), contendo 2mM dATP, 2 mM dCTP, 2mM dGTP, 1,9 mM dTTP e 0,1 mM DIG-11-dUTP.

Após a reação de amplificação, apenas uma banda deve ser visível após coloração com EtBr, pois, mesmo quantidades mínimas de produtos secundários podem afetar a especificidade da hibridação. Para melhores resultados, a banda amplificada foi cortada, purificada e por fim foi adicionada solução de pré-hibridação para conservação a -20 °C

Solução de pré-hibridação: SSC 5x; solução bloqueadora 1 %; sarcosil 0,1 %; SDS 0,02 %

10.2 Hibridação

O processo de pré-hibridação tem como objetivo preparar a membrana para a ligação da sonda, bloqueando os locais de ligação inespecíficos na membrana, permitindo assim a redução do *background* na mesma.

A temperatura de hibridação foi decidida de acordo com a percentagem de bases idênticas esperada entre o DNA sonda e o DNA alvo. Para sondas com 100 % de bases seriam idênticas ao DNA alvo, a temperatura de hibridação é de 65 °C na ausência de formamida e de 45 °C na presença da mesma (como é o caso) (Casey and Davidson, 1977). Caso a homologia fosse inferior, utilizar-se-ia a temperatura de hibridação de 45 °C, na ausência de formamida, o que na teoria permitiria detetar sequências de DNA com 65 % de bases idênticas.

Material e Métodos

Todas as hibridações decorreram do modo descrito em seguida.

Hibridação

1. Introduzir a membrana num frasco de vidro fechado com tampa, e adicionar solução de pré-hibridação (20 ml por cada 100 cm² de membrana).
2. Pré-hibridar a membrana durante 2 h à temperatura de hibridação.
3. Desnaturar a sonda marcada (ferver 10 min e arrefecer em gelo).
4. Retirar a solução de pré-hibridação e colocar a membrana em solução de hibridação, na qual foi previamente diluída a sonda marcada.
Solução de hibridação: SSC 5x; solução bloqueadora 1 %; sarcosil 0,1 %; SDS 0,02 % e a sonda marcada diluída.
5. Incubar a membrana durante 14-16 h à temperatura adequada, no forno de hibridação.
6. Após hibridação, verter a solução para um tubo e armazenar a -20 °C. Para reutilizar, descongelar a solução a 68 °C durante 10 min, uma vez que, contém 50 % de formamida.

10.3 Lavagens das membranas e deteção

As lavagens com as soluções I e II tem como objetivo remover toda a sonda não ligada, permitindo também reduzir o *background* na membrana.

A imunodeteção das sondas hibridadas baseou-se na utilização do anticorpo específico anti-digoxigenina conjugado com a fosfatase alcalina (anti-DIG-AP). A ação da enzima fosfatase alcalina (desfosforilação) sobre os substratos colorimétricos NBT/BCIP (Roche Molecular Biochemicals) revela a presença de híbridos DNA-DNA. O procedimento de deteção foi realizado à temperatura ambiente e com agitação suave, à exceção dos 2 últimos passos.

Lavagem das membranas e detecção

1. Lavar a membrana duas vezes, 5 min com solução de lavagem I à temperatura ambiente.

Solução de lavagem I: SSC 2x; SDS 0,1 %

2. Lavar a membrana duas vezes, 15 min com solução de lavagem II à temperatura de hibridação (aquecer previamente a solução).

Solução de lavagem II: SSC 0,5x; SDS 0,1 %

3. Lavar 5 minutos com tampão de ácido maleico.

Tampão de ácido maleico: ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M (pH 7,5)

4. Incubar 30 min em solução bloqueadora para bloquear a membrana (1 ml *blocking reagent*: 9 ml ácido maleico).

5. Diluir anti-DIG AP conjugante (1:5000) em solução bloqueadora.

6. Incubar a membrana em solução de anticorpo durante 30 min.

7. Lavar duas vezes, 15 min em tampão de ácido maleico.

8. Preparar solução corante (200 µl NBT/BCIP em 10 ml de tampão de detecção).

Tampão de detecção: Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 50 mM.

9. Lavar 5 min em tampão de detecção.

10. Incubar a membrana em solução corante no escuro.

11. Parar a reação lavando a membrana com dH₂O estéril ou TE.

11. Construção de uma biblioteca de mutantes

Para a construção de uma biblioteca de mutantes de inserção aleatória foi utilizado o kit comercial EZ-Tn5 <KAN-2> Tnp (Epicentre®). A técnica utilizada tem como princípio a inserção do complexo estável transposição-transposase que contém o gene de resistência à canamicina Tn903 (Kan^R). O complexo é ativado por Mg²⁺ intracelular e o transposão é inserido aleatoriamente no DNA genómico do hospedeiro, posteriormente as células que incorporarem o transposão serão mutantes nulos no gene que foi alvo de inserção (Li et al., 2007a; Lin et al., 2009). O protocolo pressupõe a aplicação de um pulso elétrico às células eletrocompetentes, com o objetivo de serem criados poros temporários na membrana plasmática permitindo que o DNA possa atravessar a bicamada lipídica (Lofblom et al., 2007).

11.1 Preparação de células eletrocompetentes

A preparação das células eletrocompetentes foi efetuada de acordo com procedimentos anteriormente descritos (Li et al., 2007a; Lofblom et al., 2007). Resumidamente, a estirpe foi inoculada em meio LB como descrito anteriormente, e incubada a 30 °C a 180 rpm até atingir o final da fase exponencial, com uma densidade ótica a 600 nm de aproximadamente 0,9 ($DO_{600} \approx 0,9$), determinado através da realização de uma curva de calibração. A preparação das células obtidas envolveu os seguintes passos:

Preparação de células eletrocompetentes

1. Centrifugar a cultura, previamente refrigerada (para parar o crescimento celular), a 8000 rpm e a 4 °C durante 10 min (usar 4 tubos de centrifuga de 25 ml).
2. Remover o sobrenadante com cuidado e ressuspender os 4 *pellets* num volume total de 20 ml de glicerol 10 % refrigerado.
3. Centrifugar novamente a 8 000 rpm e a 4 °C durante 10 min e rejeitar novamente o sobrenadante.
4. Ressuspender o *pellet* em glicerol 10 % mas desta vez em 15 ml e centrifugar 8000 rpm e a 4 °C durante 10 min e por conseguinte remoção do sobrenadante.
5. Ressuspender o *pellet* em 10 ml de glicerol 10 % e centrifugar novamente a amostra a 8000 rpm e a 4 °C durante 10 min. Remover o sobrenadante com cuidado.
6. Ao sedimento, adicionar 300 µl de glicerol 10 % e ressuspender as células cuidadosamente com uma pipeta de 200 µl.
7. Distribuir 50 µl de células da ressuspensão em microtubos de 1,5 ml para posterior utilização. As células devem ser conservadas e armazenadas num *Mr. Frosty*¹ (Nalgene), a -80 °C.
8. Congelar *overnight* antes de utilizar as células.
9. As células eletrocompetentes de foram preservadas a -80 °C até á utilização.

¹Mr. Frosty – unidade de frio com isopropanol, para congelamento rápido de células.

11.2 Eletroporação de células eletrocompetentes

Esta técnica foi desenvolvida utilizando o equipamento *MicroPulser Electroporation Apparatus Operating da* Bio-Rad, e o procedimento foi realizado tendo em conta as instruções fornecidas pela casa comercial.

Eletroporação de células eletrocompetentes

1. Refrigerar tudo previamente antes de utilizar, nomeadamente as cuvetes de eletroporação (BioRad) e o suporte do aparelho (BioRad).
2. Adicionar 1 µl de solução contendo o transposão (20 ng de DNA) a 50 µl de células eletrocompetentes, homogeneizar com cuidado e contabilizar 1min.
3. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur colocar na cuvette de 2 mm e colocar no eletroporador.
4. Selecionar o programa otimizado para *E. coli* (EC2) no equipamento (BioRad) (“pulso” de $\approx 2,5$ kV durante ≈ 5 ms).
5. Adicionar rapidamente 1 ml de meio SOC à cuvette com as células eletroporadas.
6. Transferir as células para um microtubo de 2 ml e incubar a 30 °C, durante 1 h a 200 rpm.

11.2.1 Controlo da eletroporação

Para determinar se a técnica de eletroporação estaria a funcionar corretamente, foi efetuado um controlo com células eletrocompetentes de *E. coli*. O protocolo estabelecido pela casa comercial foi elaborado e programado para estas células, quais têm uma elevada eficiência de transformação. O protocolo seguido foi igual ao descrito anteriormente.

Material e Métodos

11.3 Seleção e preservação dos mutantes

As células eletroporadas são semeadas em meio suplementado com 100 µg/ml de canamicina, uma vez que, o transposão possui um gene que codifica para a resistência a este antibiótico. Este protocolo foi adaptado para *Aeromonas* (Li et al., 2007a). Para fazer a seleção dos mutantes foram efetuados os seguintes passos:

Seleção dos mutantes

1. Semear, com o auxílio de um espalhador, diferentes quantidades (50 µl, 100 µl e 150 µl) de células eletroporadas, de modo a obter colónias isoladas, em placas de GSP suplementado com 100 µg/ml de canamicina.
2. Fazer os devidos controlos com as mesmas quantidades e nas mesmas condições, mas utilizando células eletrocompetentes e não eletroporadas, ressuspensas em meio SOC.
3. Deve ser também realizado um controlo com células eletroporadas e um controlo das células eletrocompetentes em GSP sem canamicina.
4. Incubar todas as placas a 30 °C durante 16-24 h.
5. Contar as colónias após período de incubação.

11.4 Criopreservação dos mutantes

Os mutantes obtidos foram preservados em glicerol (20 %), a -80 °C (em microtubo e placa *Multiwell 96*), conforme descrito anteriormente.

12. Caracterização da biblioteca de mutantes

Para a devida caracterização da biblioteca de mutantes foi necessário efetuar-se a verificação da estabilidade da mutação e a avaliação da aleatoriedade das mutações como se encontra descrito em seguida.

12.1 Verificação da estabilidade da mutação

De modo a verificar se a mutação se mantém, foram realizadas 10 passagens em meio GSP sem canamicina, e por último os mutantes foram novamente repicados, para GSP com 100 µg/ml de canamicina (Li et al., 2007a).

É importante referir ainda que, para saber se os mutantes pertencentes à biblioteca criada pertencem realmente à estirpe *A. hydrophila* ATCC 7966 foi amplificado e determinada a sequência do gene *gyrB* (anexo 1) em apenas alguns dos mutantes escolhidos aleatoriamente (Yanez et al., 2003).

12.2 Avaliação da aleatoriedade das mutações

Para avaliar a aleatoriedade da inserção do transposão no genoma da estirpe de *A. hydrophila* em estudo, procedeu-se à detecção por hibridação do gene que codifica para Kan^R, inserido no transposão (*EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ Kit* da Epicentre®), de acordo com o método descrito em seguida.

Deteção por hibridação

1. Extrair o DNA total de todos os mutantes em estudo como descrito no ponto 4.
2. Digerir o DNA total de cada um dos mutantes com a enzima de restrição adequada de acordo com as indicações descritas no ponto 5.
3. Separação dos fragmentos de DNA em gel de agarose 0.8 % e tampão TAE 1x.
4. Corar o gel em EtBr e registar a imagem do gel.
5. Transferir o DNA para uma membrana de nylon.
6. Pré-hibridar e hibridar a uma temperatura de 42 °C (devido à presença de 50% de formamida) como descrito anteriormente.
7. Remover a solução de hibridação e guardar a -20 °C para posterior utilização.
8. Proceder à detecção, como descrito anteriormente.

13. Avaliação fenotípica dos mutantes

13.1 Determinação da suscetibilidade a antibióticos β -lactâmicos

Para determinação da alteração da suscetibilidade a antibióticos β -lactâmicos como o imipenemo, a cefotaxima e a ampicilina, os mutantes foram expostos a um gradiente de concentrações destes antibióticos, determinando-se a respetiva concentração mínima inibitória (MIC) (Lin et al., 2009). Apenas os mutantes com fenótipos de resistência alterados foram escolhidos para posterior caracterização e identificação.

A interrupção de um gene específico, que produz uma alteração significativa do valor de MIC, para um determinado antibiótico estará, certamente envolvida no mecanismo

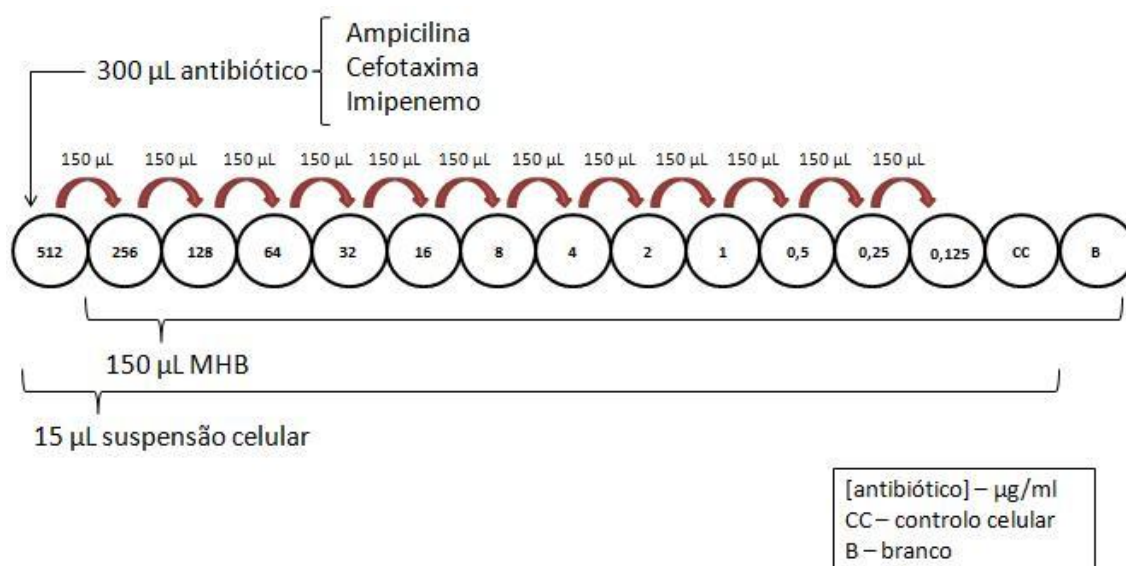
Material e Métodos

de resistência, constituindo um importante alvo de investigação, tal como deverá desempenhar um papel importante na resistência a agentes antimicrobianos.

Os valores das concentrações mínimas inibitórias determinados permitiram classificar a estirpe nas categorias sensível, intermédia ou resistente de acordo com os critérios do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)(CLSI, 2006).

Técnica de determinação de MIC pelo método de microdiluição (*Multiwell 96*)

1. Preparar uma suspensão de 0,5 *MacFarland* de cada mutante e da estirpe *wild-type*, para servir como controlo, em 1 ml de NaCl 0,9 %.
2. Pipetar para uma placa *Multiwell 96* de acordo com o esquema:



3. Efetuar este passo para cada um dos mutantes e para a estirpe *wild-type* respetivamente.
4. Deve-se pipetar inicialmente a meio MHB, em seguida o antibiótico e só por último a suspensão celular de cada um dos mutantes. Cada um dos poços fica com uma concentração de antibiótico diferente. Estas concentrações são: 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml e 0,125 µg/ml, dispostas por esta mesma ordem.
5. Incubar durante 16-24 h a 30 °C
6. Efetuar a leitura da DO a 550 nm, num espectrofotómetro de leitura de placas.

13.2 Determinação da formação de Biofilme

Existe uma variedade de sistemas viáveis para a examinação da formação de biofilme, um dos quais é o sistema estático de determinação da formação de biofilme em placas *Multiwell 96*. Este método é útil para avaliar a adesão de bactérias, medindo a coloração da biomassa aderente. O protocolo utilizado foi uma versão modificada do que foi descrito por Merritt, baseado na quantificação de biofilme por coloração com violeta de cristal (Merritt et al., 2011).

Resumidamente, esta técnica consiste no cultivo de células em placas durante um período de tempo desejado sendo em seguida os poços lavados para remover células planctónicas. As células restantes, que ficaram aderidas aos poços, são subsequentemente marcadas com um corante que permite a visualização do padrão de ligação. Este corante de superfície associado também pode ser solubilizado para a avaliação semi-quantitativa da formação de biofilme (Burmolle et al., 2006; Merritt et al., 2011).

Neste estudo, a formação de Biofilme foi avaliada na presença de antibiótico, uma vez que, gostaríamos de saber qual o comportamento dos mutantes, relativamente à *wild-type*, juntamente com as alterações que eles poderão ter na presença dos antibióticos β -lactâmicos em estudo (Kaplan et al., 2012).

Ensaio de Biofilme estático pelo teste do violeta de cristal (*Multiwell 96*)

1. Realização de um pré-inóculo com antibiótico: inocular uma colónia em 5 ml de LB suplementado com antibiótico (1/2 do valor de MIC do antibiótico a testar) e incubar overnight a 30 °C e 180 rpm.
2. Fazer uma diluição de 1:100 do pré-inóculo realizado no dia anterior, num microtubo. Ler a DO_{600} para tentar fazer uma estimativa do nº de células/poço.
3. Colocar na placa 100 μ l em cada poço, realizando 6 réplicas de cada mutante, WT e um controlo negativo (poços não inoculados).
4. Incubar a placa durante 24 h a 30 °C sem agitação.
5. Transferir o sobrenadante para uma nova placa e ler no leitor de microplacas a 550-600 nm.

-
6. Lavar os poços com 200 µl de PBS (1x) e repetir o processo duas vezes.
 7. Remover a totalidade do PBS.
 8. Adicionar 50 µl violeta de cristal 0,1 % (V/V) em água e incubar 15 min à temperatura ambiente.
Nota: Filtrar a solução para eliminar partículas em suspensão.
 9. Remover a totalidade do violeta de cristal.
 10. Lavar os poços com 200 µl de PBS duas vezes.
 11. Remover a totalidade do PBS e deixar secar.
 12. Adicionar 100 µl de etanol 95 % para solubilizar o biofilme e ler no leitor de microplacas a 550 nm.
-

14. Identificação dos mutantes

14.1 RATE-PCR

Esta técnica consiste na amplificação aleatória das extremidades do transposão, através da realização de 3 reações de PCR. Depois da realização destes foram obtidos um conjunto de fragmentos de DNA.

Resumidamente, no RATE-PCR a primeira e a terceira reação de PCR são realizadas a uma temperatura de maior especificidade do *primer*, não mais de 5 °C a baixo da temperatura de *melting* do *primer* utilizado (anexo 1). A segunda reação é realizada a 45°C, o que permite uma amplificação não específica do produto de cadeia simples resultante da primeira reação, enquanto que a terceira reação irá amplificar ambos os produtos específicos e não específicos resultantes da segunda reação. Este protocolo foi adaptado a partir das condições sugeridas pelo fornecedor (Epicentre®).

As reações de PCR foram efetuadas nas condições descritas anteriormente com exceção das condições a seguir indicadas.

1ª reação de PCR

	Concentração em stock	Volume
H ₂ O	---	11,75 µl
MgCl ₂	25 mM	3 µl
dNTP's	2 mM	2,5 µl
Tampão 10x PCR com NH ₄ ⁺	10x	2,5 µl
Primer Inv-2	10 µM	2 µl
DMSO	5 %	1,25 µl
Taq polimerase	1 U/µl	1 µl
DNA molde	50-100 ng	1 µl
Volume final		25 µl

O programa utilizado para a 1ª reação foi:

- Desnaturação inicial de 5 min a 95 °C
- 30 ciclos de Amplificação (desnaturação a 95 °C, 30 seg; emparelhamento/*annealing* a 55 °C, 30 seg; extensão a 72 °C, 3 min)
- Extensão final de 10 min a 72 °C.

Para a 2ª reação não foi adicionado qualquer reagente, apenas se sujeitou a 1ª reação a um segundo ciclo de amplificações em que foram alteradas as condições de *annealing* (45 °C em vez de 55 °C) e de extensão (3 min em vez de 2 min).

Do mesmo modo, na 3ª reação de PCR utilizaram-se novamente as condições da 1ª reação.

O resultado das 3 reações de PCR é visualizado numa electroforese realizada num gel de agarose de 1 % em TAE 1x.

14.2 Detecção do local de inserção

Os produtos resultantes do RATE-PCR depois de purificados foram sequenciados usando os serviços da companhia GATC Biotech AG Laborteam (Konstanz, Germany) e utilizando o primer direto (KAN-2 FP-1) fornecido pelo EZ::Tn5 <KAN-2> Insertion Kit

Material e Métodos

(anexo 1). Depois da sequenciação, os locais de inserção do transposão são determinados, em comparação com as sequências do genoma de *A. hydrophila*, depositadas nas bases de dados, utilizando a ferramenta bioinformática blastn (NCBI) (Altschul et al., 1997).

IV. RESULTADOS E

DISCUSSÃO

1. Construção da biblioteca de mutantes

Para a construção de uma biblioteca de mutantes de inserção aleatória foi utilizado o *kit* comercial EZ-Tn5 <KAN-2> Tnp (Epicentre®), seguindo um método de mutagenese por transposição no genoma de *Aeromonas hydrophila* CECT 839 (ATCC 7966^T). Esta técnica foi utilizada em várias bactérias Gram-negativas nos estudos efetuados por Hoffman, Li, Lin e Lofblom (Hoffman et al., 2000; Li et al., 2007a; Lin et al., 2009; Lofblom et al., 2007).

1.1 Preparação de células competentes e eletroporação

A preparação de células eletrocompetentes foi estabelecida de modo a facilitar a entrada do transposão nas células por eletroporação. Usou-se uma cultura em meio líquido no final da fase exponencial de crescimento. Posteriormente, foram realizadas múltiplas lavagens com glicerol 10 % estéril (como referido no ponto 11.1 da seção de material e métodos), para remover os sais que pudessem interferir com a eletroporação.

As células eletrocompetentes foram transformadas com o transposão utilizando o protocolo de eletroporação baseado no manual do próprio aparelho de eletroporação. Foi selecionado o programa desenvolvido para *E. coli* (EC2) no equipamento (BioRad), e as condições utilizadas foram: 2,5 kV/cm e 1000 Ω (em 5ms). No entanto, estas condições podem não ser reproduzidas com exatidão, dependendo da qualidade da preparação, do tipo de células e até da qualidade da água, podendo ocorrer algumas variações que posteriormente poderão ter alguma influência. O processo de transformação e produção de mutantes baseia-se na inserção do complexo transposão-transposase, que é estável na ausência de iões magnésio. O complexo é ativado por Mg^{2+} intracelular e o transposão é inserido aleatoriamente no DNA genómico do hospedeiro, posteriormente as células que incorporarem o transposão serão mutantes nulos no gene que foi alvo de inserção. Esta técnica constitui uma ferramenta ideal para a criação de mutantes, tal como foi já demonstrado para *Aeromonas caviae* (Li et al., 2007a) e para *Campylobacter jejuni* (Lin et al., 2009; Riess et al., 2003).

Assim, após eletroporação as células foram selecionadas em placas de GSP com 100 μ g/ml de canamicina, uma vez que, o transposão contém um gene de resistência à canamicina.

Resultados e Discussão

De modo a verificar o sucesso deste protocolo foi calculada a eficiência de transformação, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de transformação: } \frac{\text{nº de transformantes obtidos}}{\text{quantidade de DNA plaqueado } (\mu\text{g})}$$

O resultado obtido para 20 ng de DNA utilizado na transformação é de 3.60×10^3 , o que sugere uma reduzida eficiência de transformação quando comparada a outras bactérias. De acordo com o protocolo do fornecedor (Epicentre), a eficiência de transformação, utilizando o mesmo transposão do presente estudo, para *Escherichia coli* é $> 10^5$, para *Salmonella typhimurium* é $> 10^4$, para *Proteus vulgaris* é $> 10^3$ e para *Pseudomonas* spp. é $> 10^2$, sempre para um volume de 20 ng de DNA utilizado na transformação. Este resultado provou que a *A. hydrophila*, através de um procedimento de eletroporação, é passível de manipulação genética de uma maneira semelhante à de *E. coli*, embora com uma eficiência de transformação inferior. O primeiro estudo realizado sobre preparação de células eletrocompetentes e transformação de *A. hydrophila* foi realizado por Fengqing and Song (2005) e descreve uma eficiência de transformação de 10^2 CFU/ μg DNA a 12.5 kV/cm e 1000 Ω (em 5ms), para um plasmídeo com pBBR1MCS (4,7 kb) (Fengqing and Song, 2005).

Relativamente aos controlos efetuados, não houve crescimento celular, nem nas placas com 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de canamicina, onde foram semeadas células não transformadas, nem no controlo da estirpe parental, onde esta estirpe foi semeada numa placa com a mesma concentração de canamicina. Estes resultados indicam que as colónias resistentes à canamicina não eram mutantes espontâneos (Li et al., 2007a). Outro ensaio consistiu na transformação de células eletrocompetentes de *E. coli*, adquiridas comercialmente, utilizando o mesmo transposão e seguindo o mesmo procedimento, tendo como objetivo comparar a eficiência de transformação (figura 6A). O resultado obtido foi de $1,44 \times 10^5$ e está de acordo com o valor esperado, referido anteriormente. Como podemos verificar esta estirpe tem uma elevada eficiência de transformação e face ao resultado obtido, podemos admitir que o protocolo foi realizado com sucesso.

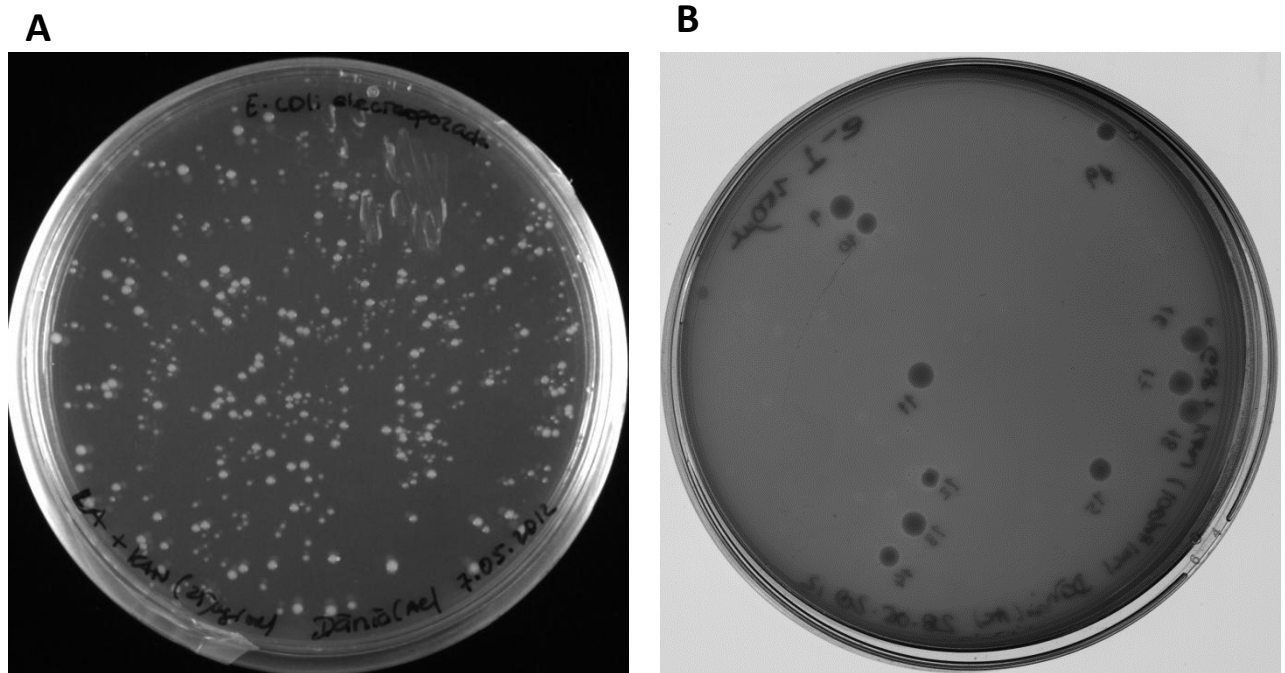


Fig. 6 – Resultados da eletroporação em LB (A) e GSP (B) suplementados com 100 µg/ml de canamicina. **A** – Mutantes de *E. coli* (kan^R), resultantes da eletroporação. **B** – Mutantes de *A. hydrophila* (kan^R), resultantes da eletroporação.

No presente estudo, após eletroporação conseguimos obter um total de 86 mutantes (48 mutantes de uma primeira eletroporação + 38 mutantes de uma segunda eletroporação), selecionados em placas de GSP com 100 µg/ml de canamicina. Na figura 6B podemos ver uma das placas com alguns mutantes de *A. hydrophila* pertencentes a esta biblioteca. Esta metodologia já foi aplicada em inúmeros estudos, para outros microrganismos, que por sua vez terão mais facilidade em adquirir o transposão nas suas células, dando origem a bibliotecas representativas do genoma, nomeadamente para *Pseudomonas aeruginosa* (Li et al., 2007a; Lin et al., 2009; Lofblom et al., 2007). Uma das razões pela menor eficiência de transformação em *Aeromonas* pode estar relacionada com a expressão de nucleases de restrição por parte das células hospedeiras alvo. Está descrito que a expressão de enzimas de restrição constitui um mecanismo importante de defesa bacteriana contra DNA exógeno (Arber, 1979).

Para a construção de uma biblioteca de mutantes não redundante e representativa do genoma de *A. hydrophila* (4121 ORFs) seria necessário a obtenção de cerca de 19000 mutantes. O número de mutantes (N) necessários, para assegurar que uma ORF com 1 Kb está representada na biblioteca (para uma probabilidade $p > 0,5 \%$), é estimado pela

Resultados e Discussão

seguinte equação: $N = [\ln(1-P)/\ln(1-f)] \times 6$ grelhas de leitura; em que f representa a fração do genoma determinada por cada gene (com 1 Kb) (McCann et al., 2011).

E só a avaliação fenotípica de todos estes mutantes permitiria determinar o resistoma completo de *A. hydrophila*.

2. Caracterização da biblioteca de mutantes

Para a devida caracterização da biblioteca de mutantes foi necessário verificar a estabilidade das mutações obtidas e avaliar a sua aleatoriedade, como se encontra descrito em seguida.

2.1 Verificação da estabilidade da mutação

De modo a verificar se a mutação é estável, foram realizadas 10 passagens em meio GSP sem canamicina, seguidas por uma última passagem em GSP suplementado com 100 µg/ml de canamicina. Todos os mutantes mantiveram o fenótipo de resistência, ou seja, preservam o gene que lhes conferia resistência à canamicina, o que indica uma estabilidade da inserção do transposão em todos os mutantes (100 %) (Li et al., 2007a).

Para despiste de eventual contaminação, foram selecionados, aleatoriamente, alguns mutantes da biblioteca gerada para amplificação e sequenciação parcial do gene *gyrB* (anexo 1) (Yanez et al., 2003). A análise da sequência permitiu confirmar a sua identidade.

Para confirmar que o fenótipo de resistência à canamicina apresentado pelos mutantes é conferido pela inserção do transposão, procedeu-se à amplificação do gene de Kan^R contido no interior do transposão, por PCR. Foram escolhidos aleatoriamente alguns dos mutantes resistentes à canamicina, pertencentes à biblioteca, e após análise dos resultados, podemos observar que estes produziram uma banda com o tamanho esperado (816 pb), que se encontra ausente para a estirpe parental como apresentado na imagem de um gel, na fig. 7.

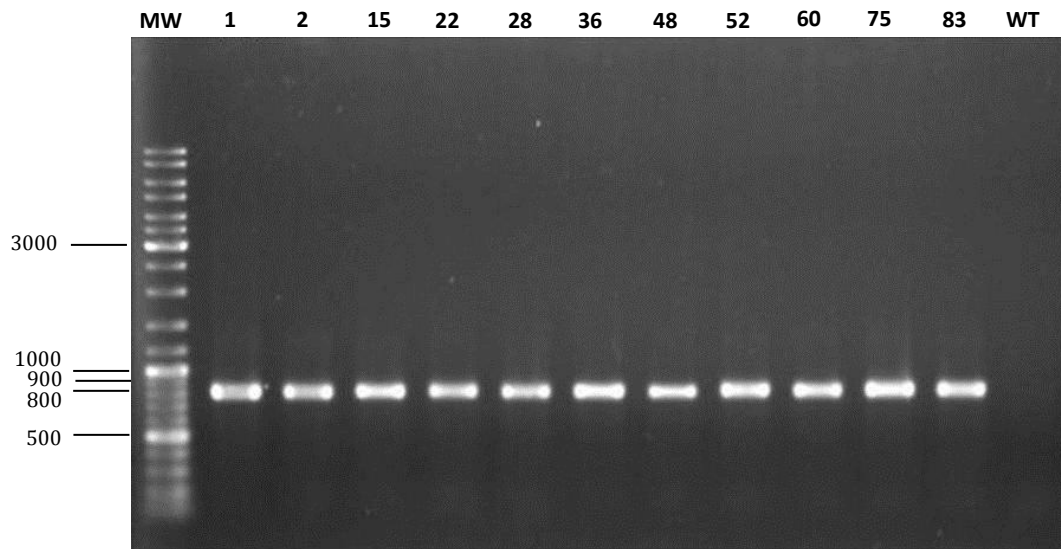


Fig. 7 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR obtidos para amplificação do gene de Kan^R inserido no transposão. MW: marcador de peso molecular em pares de bases (pb) (anexo 2); os números representam os diferentes mutantes; WT: *wild-type* (estirpe parental).

2.2 Avaliação da aleatoriedade das mutações

A aleatoriedade da inserção do transposão foi estudada pela avaliação de 4 mutantes selecionados aleatoriamente a partir de uma biblioteca de 86 mutantes. Esses mutantes selecionados, conjuntamente com a estirpe parental, foram sujeitos à detecção por hibridação do gene que codifica para a resistência à canamicina, inserido no transposão, de modo a verificar o padrão de inserção do transposão no cromossoma. Esta amostragem pareceu-nos significativa, uma vez que, estudos já realizados escolheram apenas 11 mutantes de uma biblioteca de 20 000 (Li et al., 2007a).

O DNA genómico dos mutantes selecionados foi isolado e digerido por a enzima de restrição *Sall*. Foi utilizada esta enzima, uma vez que, esta não corta o gene de canamicina que se encontra no transposão. No entanto, no transposão, imediatamente a seguir ao gene de resistência, existe uma região que contempla vários locais de restrição para diferentes endonucleases (*Polylinker*), que inclui uma sequência de reconhecimento para *Sall*, o que permite garantir que esta enzima irá cortar uma única vez o interior do transposão, como mostra o esquema da figura 7. Assim, os fragmentos obtidos pela digestão com *Sall* dos mutantes selecionados foram separados por

Resultados e Discussão

eletroforese em gel de agarose e transferidos para uma membrana de nylon (Amersham HybondTM - N⁺). A técnica de hibridação usou como sonda o produto de PCR do gene de resistência à canamicina, marcado com o sistema DIG de Marcação e Detecção Não-radioativa de Ácidos Nucleicos (Roche); permitiu detetar bandas individuais de tamanhos diferentes em cada um dos perfis *SalI* dos mutantes testados (Fig. 8) sendo que o perfil da estirpe parental não apresentava nenhuma banda. Estes resultados sugerem que as inserções ocorreram de forma aleatória no genoma interrompendo regiões distintas e individuais (Li et al., 2007a).

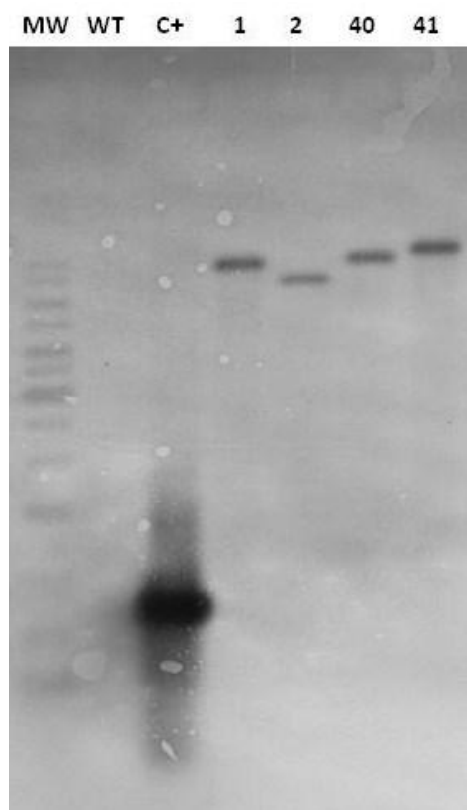


Fig. 8 – Hibridação dos mutantes. A imagem contém os mutantes selecionados (1, 2, 40 e 41), o marcador de pesos moleculares em pares de bases (MW) (anexo 2) e a estirpe parental (WT – *wild-type*).

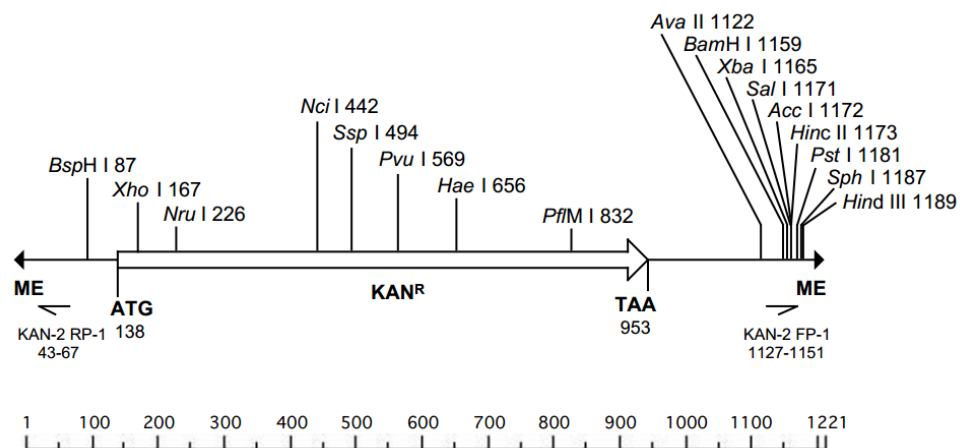


Fig. 9 – Mapa de restrição do transposão EZ-Tn5TM <KAN-2> (1221 pb) (Epicentre).

3. Avaliação fenotípica dos mutantes

3.1 Determinação da suscetibilidade a antibióticos β -lactâmicos

A biblioteca de mutantes desenvolvida foi caracterizada relativamente ao seu fenótipo de resistência a antibióticos β -lactâmicos, através da determinação da suscetibilidade ao imipenemo, a cefotaxima e a ampicilina. O objetivo foi o de determinar se estes mutantes apresentavam aumento ou diminuição de suscetibilidade aos antibióticos em estudo. Esta avaliação foi estabelecida em ensaios de microdiluição em placa, onde os mutantes são submetidos a um gradiente de concentrações de cada um destes antibióticos, para ser determinada a respetiva concentração mínima inibitória (MIC) (Breidenstein et al., 2008; Lin et al., 2009).

Após determinação da alteração da suscetibilidade dos mutantes, procedeu-se à análise dos respetivos resultados para cada um dos antibióticos em estudo. As alterações reprodutíveis de valores de MIC tão pequenas como duas vezes aumentada ou duas vezes diminuída foram tidos em conta. No entanto, apenas os resultados para os mutantes para os quais podemos confirmar mudanças de forma consistente em pelo menos três medições independentes foram tidos em conta.

O valor de MIC determinado para cada mutante foi comparado, em ensaio paralelo, com o valor de MIC obtido para estirpe parental *A. hydrophila* CECT 839 (sensível à cefotaxima e MIC ≥ 512 μ g/ml para ampicilina e imipenemo). A leitura dos resultados foi realizada num espectrofotómetro de leitura de placas a uma DO de 550nm, após uma incubação de 16-24 h a 30 °C.

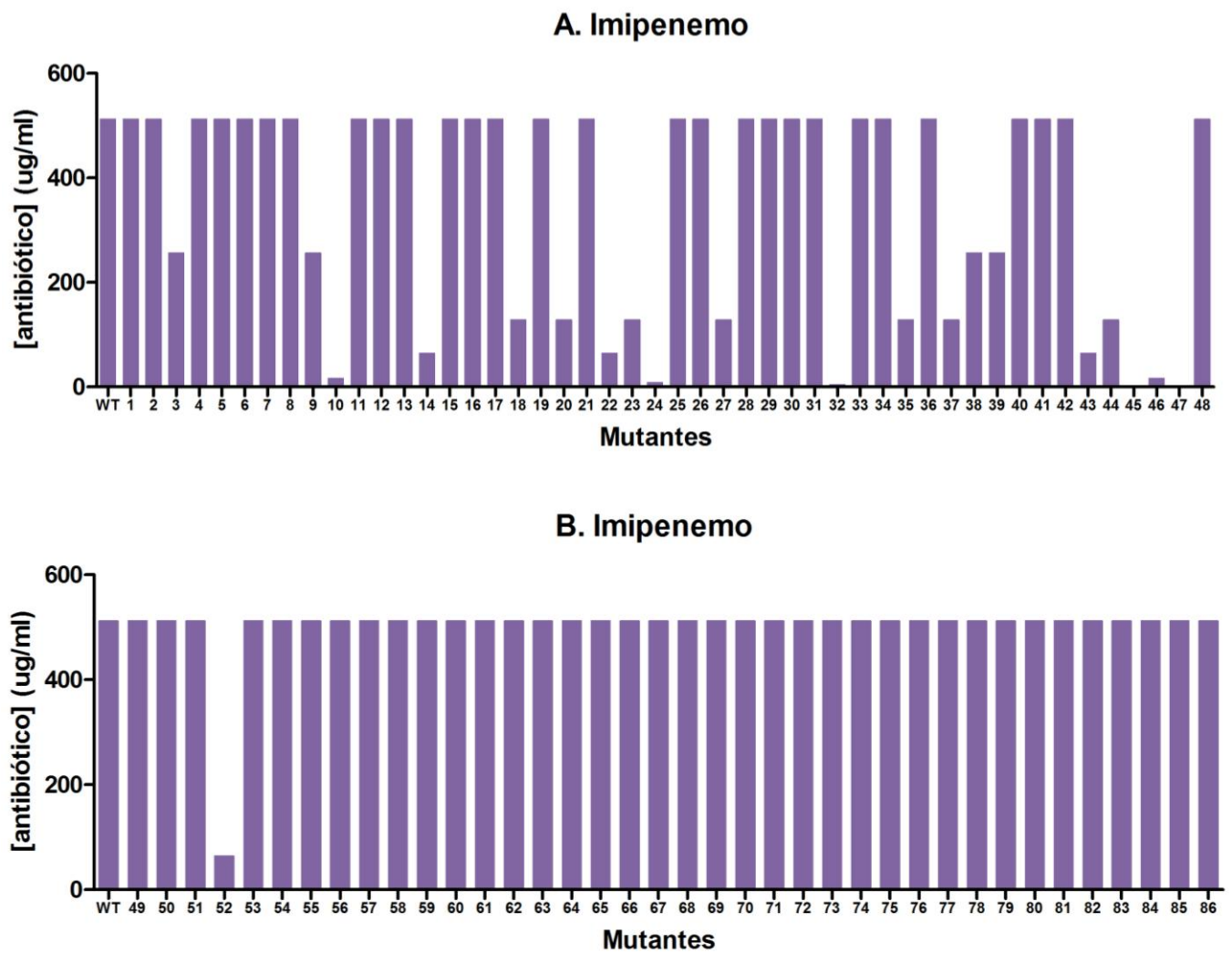


Fig. 10 – Alterações da suscetibilidade ao imipenemo nos mutantes 1-48 (A) e mutantes 49-86 (B) e a respetiva estirpe parental (WT). Os valores de concentração de antibiótico testados variam entre 0,125 e 512 $\mu\text{g/ml}$ de imipenemo.

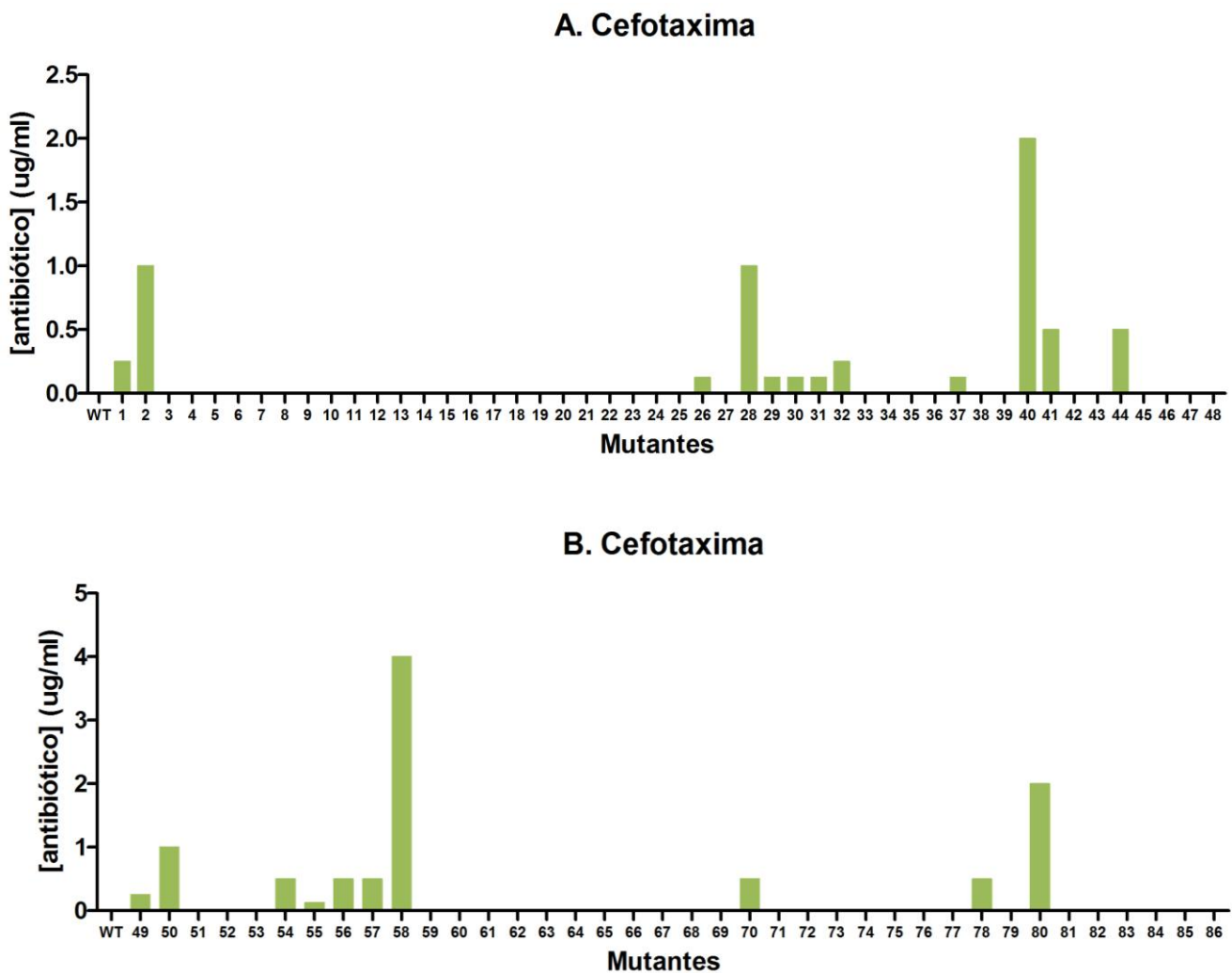


Fig. 11 – Alterações da suscetibilidade à cefotaxima nos mutantes 1-48 (A) e 49-86 (B) e a respetiva estirpe parental (WT). Os valores de concentração de antibiótico testados variam entre 0,125 e 512 $\mu\text{g/ml}$ de cefotaxima.

Os valores dos MICs determinados permitiram classificar os mutantes nas categorias sensível, intermédia ou resistente de acordo com os critérios do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)(CLSI, 2006).

Como podemos verificar não estão presentes os gráficos correspondentes às alterações de suscetibilidade ao antibiótico ampicilina, uma vez que não foram detetadas alterações de MIC para este antibiótico, com exceção do mutante 24. A MIC obtida para este mutante foi de 8 $\mu\text{g/ml}$ em vez de $>512 \mu\text{g/ml}$ (estirpe parental).

Resultados e Discussão

Verificou-se também que o mutante 24 manifesta uma reduzida taxa de crescimento na ausência de antibiótico.

Globalmente, a biblioteca de mutantes gerada inclui 43 mutantes com suscetibilidade alterada à cefotaxima (22 mutantes) e ao imipenemo (21 mutantes). Mais de 50 % da coleção de mutantes não apresenta alterações de suscetibilidade aos antibióticos testados.

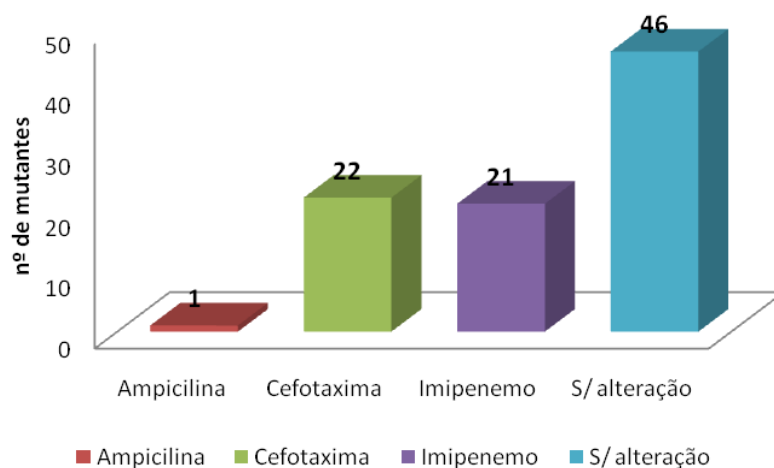


Fig. 12 – Número de mutantes com alteração de fenótipo de resistência aos diferentes antibióticos β -lactâmicos (ampicilina, cefotaxima e imipenemo).

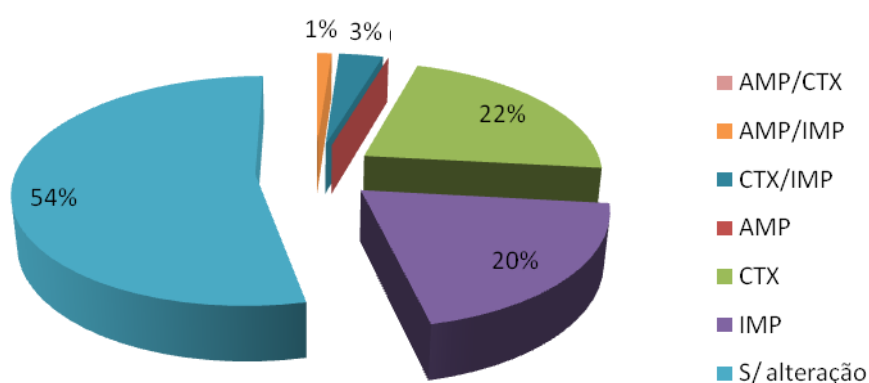


Fig. 13 – Caracterização da biblioteca de mutantes relativamente ao fenótipo de resistência a antibióticos β -lactâmicos. Mutantes sem alteração do fenótipo de suscetibilidade (■); Mutantes com alteração do fenótipo de resistência a um (■) ou a uma combinação de antibióticos (■). Os valores estão expressos em percentagem (%).

Através da análise do gráfico representado na fig. 13, podemos verificar que 54 % dos mutantes não apresenta qualquer alteração no fenótipo de resistência; 1 % apresenta alteração do valor de MIC à ampicilina e ao imipenemo simultaneamente; 3 % apresenta alteração de fenótipo para os antibióticos cefotaxima e imipenemo conjuntamente e nenhum dos mutantes apresenta alteração cumulativa nos valores de MIC à ampicilina e à cefotaxima. Em relação à percentagem de mutantes que apresenta uma alteração da suscetibilidade a um único antibiótico, 22 % dos mutantes apresenta alteração apenas à cefotaxima, 20 % apresenta alteração ao imipenemo e não foram registados mutantes com alteração apenas à ampicilina.

Se analisarmos o aumento ou diminuição de suscetibilidade para cada antibiótico, comparativamente com a estirpe parental, os resultados obtidos permitem a identificação de um mutante com aumento de suscetibilidade para ampicilina, 21 mutantes com aumento de suscetibilidade para imipenemo e 22 mutantes com diminuição de suscetibilidade para cefotaxima. Uma grande vantagem deste tipo de estudos é que mesmo pequenas alterações na resistência podem ser detetadas. As alterações mais relevantes nos valores de MIC foram registadas para o mutante 58, relativamente à cefotaxima, correspondendo a um decréscimo de suscetibilidade de 6 vezes, para o mutante 24, relativamente à ampicilina, com aumento de suscetibilidade em 6 vezes, e para o mutante 47, um aumento de suscetibilidade de 10 vezes, relativamente ao imipenemo. Os outros mutantes apresentaram aumentos e diminuições inferiores. No entanto, tal como já foi referido anteriormente as alterações para o dobro do valor de MIC são consideradas dentro do intervalo de erro aceitável (Schurek et al., 2008). Os resultados obtidos foram confirmados através da realização do ensaio em triplicado. Pequenos aumentos de MIC podem ser indicativos de um genótipo com adaptabilidade melhorada a condições de *stress*, tais como exposição a antibióticos (Schurek et al., 2008).

3.2 Determinação da formação de biofilme

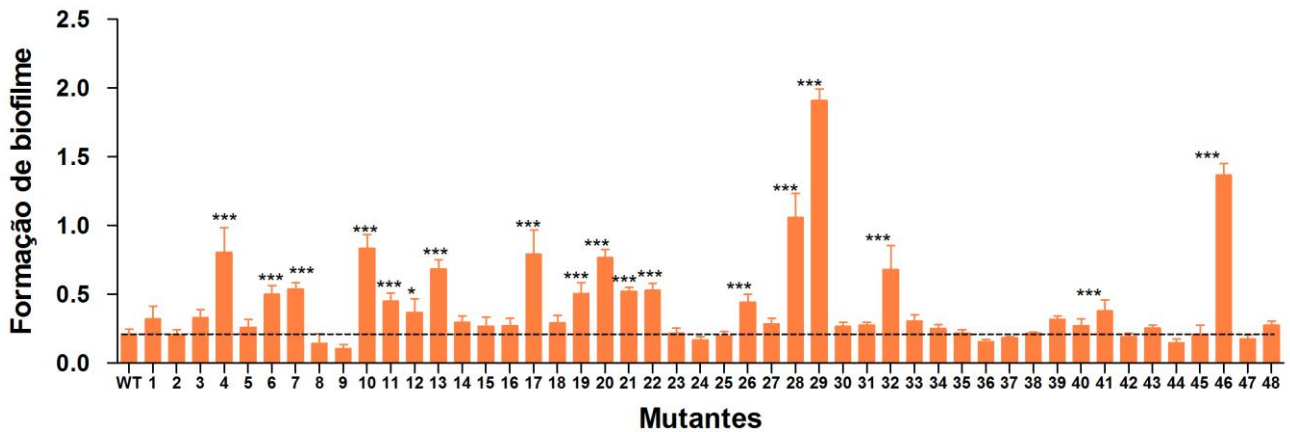
Muitas bactérias podem apresentar-se em forma de agregados a uma superfície, este comportamento é conhecido por biofilme. Como etapas importantes para a sua formação, são descritas as adesões iniciais, passando os microrganismos do seu estilo de vida planctónico ao agregado, à formação de microlónias, à maturação e ao destacamento de células, regressando por fim ao seu estilo de vida planctónico (Boari, 2009).

Para a determinação da capacidade de formação de biofilme dos mutantes, pertencentes à biblioteca desenvolvida no presente estudo, foi realizado um ensaio de biofilme estático pelo teste de violeta de cristal em placa (*Multiwell 96*). O ensaio de biofilme foi realizado após 24h de incubação a 30 °C sem agitação e tem como objetivo determinar se existem alterações na capacidade de formação de biofilme comparativamente à estirpe parental.

A formação de biofilme foi avaliada na presença do antibiótico ampicilina ($\frac{1}{2}$ do valor de MIC) e o comportamento dos mutantes foi avaliado em relação à estirpe parental (Kaplan et al., 2012).

Após a análise dos resultados podemos verificar que 20 dos 86 mutantes apresentam uma relação biofilme/células planctónicas (formação de biofilme) significativamente diferente ($p < 0,001$) comparando com a estirpe parental. No entanto, apesar de menos significativo que o resultado anterior, 4 mutantes também apresentam um resultado significativamente diferente ($p < 0,01$) e outros 4 mutantes apresentam um resultado com uma alteração comparativamente com a WT mas com pouco significado estatístico ($p < 0,05$). Perante estes resultados (fig. 14) podemos verificar que 28 mutantes demonstram uma alteração com significado estatístico.

A. Ensaio de biofilme na presença de AMP



B. Ensaio de biofilme na presença de AMP

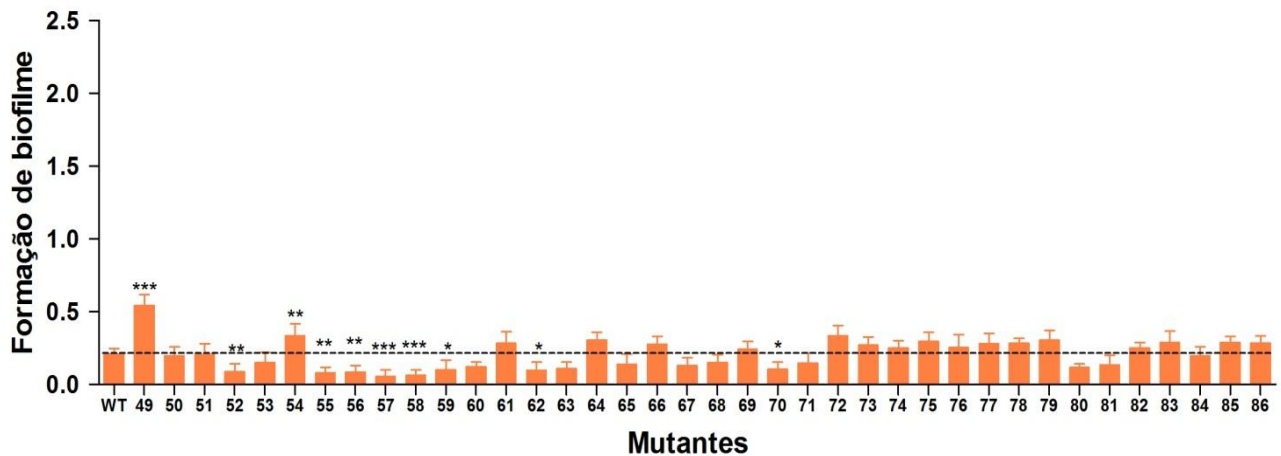


Fig. 14 - Formação de biofilme dos mutantes 1-48 (A), 49-86 (B), calculada por determinação da razão Abs_{550} biofilme / Abs_{550} células planctônicas. A linha preta representa a formação de biofilme da estirpe parental. Os dados são apresentados através da média \pm desvio padrão. O teste utilizado para determinar a significância estatística da alteração da formação de biofilme de cada mutante comparativamente com a WT foi ANOVA, seguido de um teste de comparação múltipla Dunnett (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Tem-se vindo a verificar a crescente importância do estudo de biofilmes e a sua relação com a medicina. A formação de biofilme pode ser detetada em vários implantes médicos, tais como cateteres, ancas artificiais e lentes de contacto e, devido à sua maior resistência aos agentes antimicrobianos, essas infeções podem muitas vezes ser tratadas por remoção do implante. No entanto, este procedimento acarreta consequências para

Resultados e Discussão

o paciente, como por exemplo aumento do trauma e os custos de tratamento (Licking, 1999). A ocorrência de infecções causadas por *Aeromonas* também é um facto, uma vez que, quando esta bactéria entra no trato gastrointestinal, irá ser sujeita a uma série de etapas levando à formação de biofilme, que por sua vez resultará no aparecimento de fatores de virulência, dando origem a uma infecção (Janda and Abbott, 2010). O desenvolvimento de biofilme em *Aeromonas* também pode ser regulado por *quorum sensing* (Lynch et al., 2002). No entanto, a formação biofilme tem uma enorme importância na clínica, uma vez que, de acordo com alguns estudos, eles diminuem a suscetibilidade aos antimicrobianos (Kaplan, 2011; Mah and O'Toole, 2001).

Tem sido observado que a resistência aos antibióticos de células em biofilmes é aumentada, em comparação com o que é normalmente observado com as células planctónicas (Mah and O'Toole, 2001). Pela sua relevância, procedeu-se ao estudo da relação entre a alteração da suscetibilidade aos antibióticos e a formação de biofilme nos diferentes mutantes.

3.3 Formação de biofilme e resistência a antibióticos

Se fizermos uma análise conciliando os resultados de formação de biofilme com os de resistência a antibióticos podemos verificar que resultam 17 mutantes com alteração em ambos.

Desses 17 mutantes, 4 mutantes (10, 20, 22 e 46) têm aumento de suscetibilidade ao imipenemo e aumento da formação de biofilme, 1 mutante (52) tem aumento de suscetibilidade ao imipenemo e diminuição da formação de biofilme, 6 mutantes (26, 28, 29, 41, 49 e 54) têm diminuição da suscetibilidade à cefotaxima e aumento da formação de biofilme, 5 mutantes (55, 56, 57, 58 e 70) têm diminuição da suscetibilidade à cefotaxima e diminuição da formação de biofilme e 1 mutante (32) tem aumento de suscetibilidade ao imipenemo, diminuição de suscetibilidade à cefotaxima e ainda aumento da formação de biofilme.

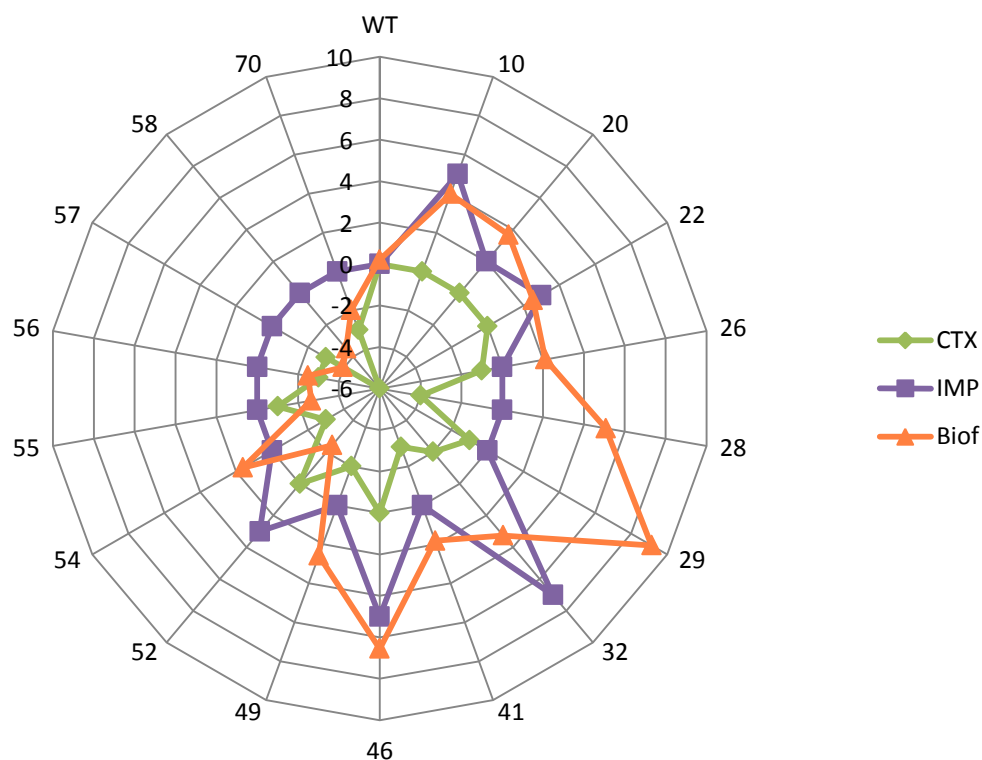


Fig. 15 – Representação das alterações dos fenótipos de resistência e capacidade de formação de biofilme dos 17 mutantes selecionados. As alterações fenotípicas são expressas por comparação com a estirpe parental, em número de vezes de suscetibilidade aumentada ou diminuída e capacidade de formação de biofilme aumentada ou diminuída. CTX – cefotaxima; IMP – imipenemo; Biof – Formação de biofilme.

De acordo com Kaplan (Kaplan, 2011) e tendo em conta outros estudos previamente realizados, as concentrações sub-inibitórias de alguns antibióticos, embora não sejam capazes de matar ou inibir o crescimento de bactérias, podem inibir a formação de biofilme. Um bom exemplo é o antibiótico azitromicina, que inibe eficazmente a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, mesmo em reduzidas concentrações (Ichimiya et al., 1996; Kaplan, 2011; Wagner et al., 2005). Uma terapia com baixa dose de azitromicina não mata a bactéria mas auxilia no melhoramento do quadro clínico através da inibição da formação de biofilme. No entanto, o contrário também é viável acontecer, a formação de biofilme parece também ser reforçada na presença de alguns antibióticos, quando presentes em concentrações inferiores ao valor de MIC (Elliott et al., 2010; Hoffman et al., 2005). De acordo com um estudo realizado por Elliot e seus colaboradores a exposição a aminoglicosídeos, nomeadamente tobramicina, induz a

Resultados e Discussão

formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose quística. Verificaram também que a indução de formação de biofilme, pode refletir um mecanismo indutível comum de resistência a aminoglicosídeos, durante infecções crónicas provocadas por *P. aeruginosa*, em pacientes com fibrose quística, podendo assim representar um alvo terapêutico útil. Futuros estudos serão necessários para identificar esse mecanismo, assim como a relação entre a indução de biofilme, a resposta à terapia, e exposição prévia a antibióticos (Elliott et al., 2010).

Um fenótipo de resistência aumentada pode também ser induzido por uma limitação de nutrientes, certos tipos de *stress*, uma densidade celular elevada ou uma combinação destes fenómenos (Mah and O'Toole, 2001). Como já foi referido anteriormente, o presente estudo tem também como um dos seus objetivos a identificação de genes que possam estar envolvidos nestas alterações de fenótipo de resistência.

Um dos mecanismos de resistência que pode ser induzido pela formação de biofilme é a alteração da composição de proteínas de membrana em resposta a agentes antimicrobianos. Essa alteração pode resultar na diminuição da permeabilidade da membrana das células a esses compostos. Mutações no gene *ompB* (regulador dos genes que codificam as proteínas OmpF e OmpC das porinas da membrana externa) e no gene *ompF* permitiram verificar o aumento da resistência a antibióticos β -lactâmicos em *E. coli* (Jaffe et al., 1982). Estes resultados, indicam que alterações ao nível da regulação da expressão de porinas, afeta a resistência intrínseca das bactérias aos agentes antimicrobianos. Recentemente verificou-se, também para *E. coli*, que a expressão de *ompC* e três outros genes (regulados por osmolaridade) aumenta com o aumento da formação de biofilme, em comparação com as células planctónicas (Prigent-Combaret et al., 1999). De acordo com o que foi referido, sugere-se que um ambiente de *stress* osmótico induz a capacidade das bactérias formarem biofilme. Tendo em conta este facto, as condições ambientais dentro do biofilme podem provocar alterações dentro do envelope da célula que protege as bactérias dos efeitos prejudiciais dos antibióticos (Mah and O'Toole, 2001). No entanto, não podemos afirmar qual a verdadeira razão das bactérias que formam biofilme, aumentarem ou diminuírem a sua suscetibilidade a agentes antimicrobianos. Como foi referido anteriormente existem vários mecanismos que poderão estar a influenciar e o facto de usarmos um antibiótico diferente poderá influenciar esta resposta por parte das bactérias. A heterogeneidade ambiental que

existe dentro de um biofilme pode também promover a formação de uma população heterogênea de células, de tal forma que, os diferentes níveis de resistência podem ser expressos em toda a comunidade (Mah and O'Toole, 2001).

Estudos que relacionem a formação de biofilme e a resistência a antibióticos β -lactâmicos em *Aeromonas* deverão ser ainda efetuados, dado que, é uma área ainda pouco pesquisada, mas com alguma relevância na clínica.

4. Identificação dos mutantes

4.1 RATE-PCR

Para a realização desta técnica procedeu-se à amplificação aleatória das extremidades do transposão, através da realização de 3 reações de PCR sequenciais. Depois da realização destes foram obtidos um conjunto de fragmentos de DNA.

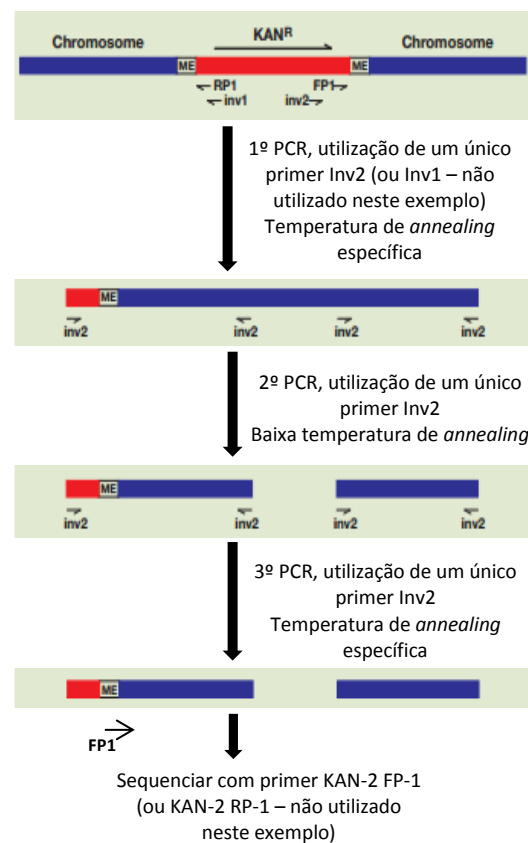


Fig. 16 – Esquema representativo da metodologia RATE-PCR (adaptado do manual do kit da Epicentre)

Resultados e Discussão

Resumidamente, no RATE-PCR as condições das diferentes reações de PCR favorecem ligações inespecíficas do primer utilizado, com o objetivo de gerar produtos de PCR que possam conter parte do transposão e parte do gene interrompido (fig. 16). Este protocolo foi adaptado a partir das condições sugeridas pelo fornecedor (Epicentre®).

A figura 17 mostra os resultados obtidos por RATE-PCR, de alguns dos mutantes que apresentam alteração de suscetibilidade aos antibióticos e da formação de biofilme simultaneamente.

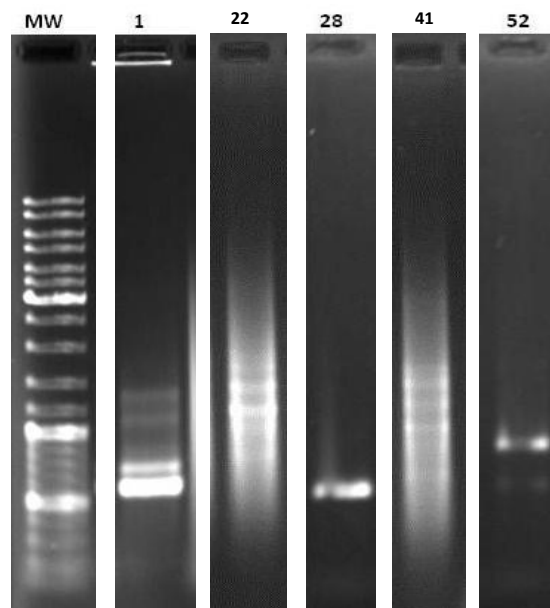


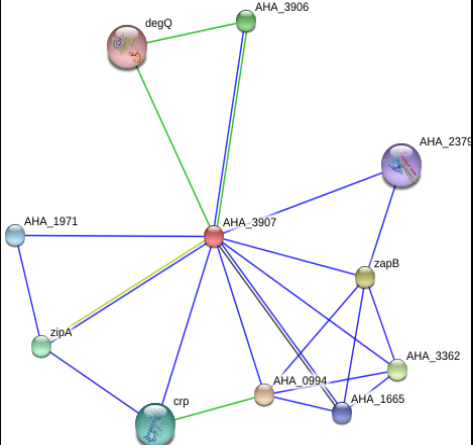
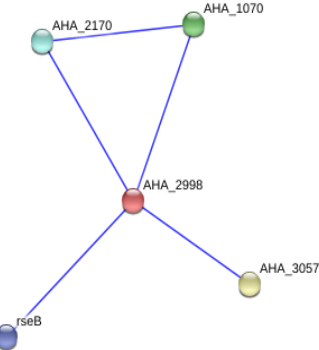
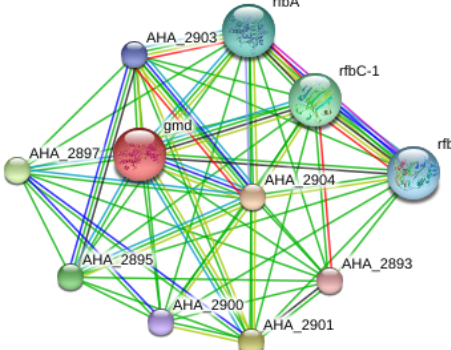
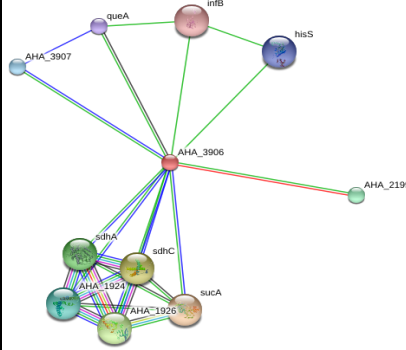
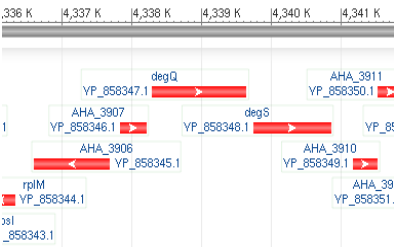
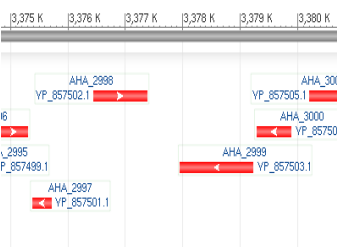
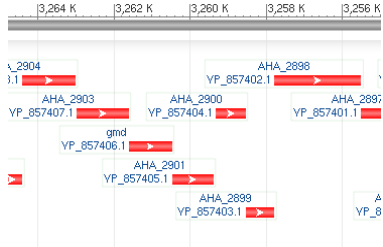
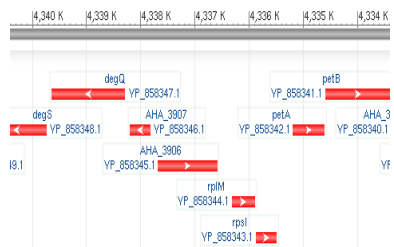
Fig. 17 – Perfil de bandas resultantes do produto do RATE-PCR. Estão representados os mutantes 1, 22, 28, 41 e 52.

4.2 Identificação dos locais de inserção e suas implicações

Os produtos resultantes das reações de RATE-PCR, depois de purificados, foram enviados para GATC Biotech (Germany) para determinação da sequência nucleotídica. O *primer* utilizado na sequenciação KAN-2 FP-1 (anexo 1) – permite selecionar, da diversidade de produtos obtidos, apenas fragmentos que contenham uma sequência parcial do transposão como podemos verificar na figura 16. As sequências obtidas permitiram identificar os locais de inserção do transposão consequentemente, identificar as ORF interrompidas, por comparação com o genoma de *A. hydrophila*, utilizando a ferramenta bioinformática *blastn* (NCBI) (Altschul et al., 1997). Os resultados encontram-se na tabela seguinte (tabela I).

Tabela I: Identificação dos mutantes por transposão em *A. hydrophila*, com alteração dos fenótipos de suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos e capacidade de formação de biofilmes. [↓diminuição ou ↑ aumento da suscetibilidade (a CTX ou a IMP) ou da formação de biofilme].

Resultados e Discussão

Mutantes	1	2	41	52
Gene interrompido	AHA_3907	AHA_2998	AHA_2902	AHA_3906
Produtos do gene	Proteína hipotética conservada	Proteína reguladora de transcrição, terminal C	GDP-manose 4,6-desidratase	ATPase, família AFG1
Fenótipo / Biofilme	Diminuição da suscetibilidade a CTX	Diminuição da suscetibilidade a CTX	Diminuição da suscetibilidade a CTX e aumento da formação de biofilme	Aumento da suscetibilidade a IMP e diminuição da formação de biofilme
Interações				
Contexto genómico				

4.2.1 Mutante 1

Os resultados da análise da sequência obtida para o mutante 1 permitiram confirmar que o gene interrompido codifica para uma proteína hipotética conservada, designada por DUF1043, cuja função ainda não está caracterizada. Assim, para tentar compreender o efeito desta proteína no mecanismo de resistência de *A. hydrophila*, procedeu-se ao estudo das suas interações com outras proteínas (tabela I).

Uma análise detalhada, através da ferramenta bioinformática *Smart* (Letunic et al., 2012), permite identificar uma interação com a proteína ZipA, que por sua vez, interage com a proteína FtsZ. ZipA e FtsZ são proteínas envolvidas no processo de divisão celular e foi estabelecida relação com a resistência a antibióticos (Méndez-Vilas, 2010). Barbati e seus colaboradores desenvolveram um estudo com mutantes, com o intuito de estudar a interação entre proteínas de divisão celular. Este estudo demonstrou que a interação entre duas proteínas de divisão celular resultou na sensibilidade a antibióticos, ao passo que a perda dessa interação confere resistência à estirpe bacteriana em estudo (Barbati et al., 2010).

Nestes últimos 10 anos, vários inibidores naturais ou sintéticos da proteína FtsZ ou do complexo FtsZ-ZipA foram identificados. Embora não seja conhecido se estes compostos podem ter ou não uma aplicação médica, dados fornecidos por Vollmer confirmam a hipótese de que estas proteínas representam um excelente alvo antibacteriano (Vollmer, 2006). Ensaio realizados em células para a detecção de inibidores da divisão celular, bem como ensaios de FtsZ GTPase levaram à identificação de vários compostos que inibem a polimerização de FtsZ, bloqueando a divisão celular das bactérias. Esses inibidores, para além de poderem ser ferramentas valiosas para a pesquisa básica, podem também levar à descoberta de novos agentes terapêuticos contra bactérias patogénicas. De acordo com Vollmer, já foram descobertas substâncias que inibem a atividade da GTPase de FtsZ e apresentam atividade antimicrobiana (Vollmer, 2006).

Relativamente ao contexto genómico (tabela I), podemos verificar que a ORF a jusante da mutação (AHA_3908) codifica para uma DegQ protease (protease serínica, que parece estar envolvida na reciclagem de proteínas produzidas em resposta ao *stress*) e deste modo seria relevante saber se a transcrição deste gene se encontra afetada pela mutação na ORF anterior (AHA_3907). Um estudo efetuado com a

Resultados e Discussão

ferramenta bioinformática *Softberry*, permitiu fazer uma previsão da presença de regiões promotoras. Foi possível detetar uma potencial região promotora, o que pode significar que a transcrição do gene DegQ não é afetada pela mutação.

4.2.2 Mutante 2

Relativamente ao mutante 2, foi possível identificar que o gene interrompido codifica uma proteína reguladora de transcrição.

As bactérias possuem diversas redes de transdução de sinal que regulam a transcrição de vários genes (Stock et al., 2000). Estas redes são constituídas por proteínas reguladoras que contêm domínios capazes de interagir entre si para processar a informação e produzir a resposta apropriada aos estímulos ambientais (Stock et al., 2000). A expressão dos genes ficará alterada conforme a sua resposta, se a alteração for localizada, estamos por exemplo na presença da indução de um gene de resistência a um antibiótico específico (White, 2000). Independentemente da resposta são necessários processos que reconheçam os sinais ambientais e os transmitam para os sistemas responsáveis pela resposta. O mecanismo de sinalização mais simples e melhor caracterizado é conhecido como sistema de dois componentes, como é o caso do sistema de dois componentes descrito anteriormente para β -lactamases denominado sistema BlrAB (Hakenbeck and Stock, 1996; Stock et al., 2000; Tayler et al., 2010).

A regulação da atividade da proteína reguladora, corresponde à mutação identificada para o mutante 2, é realizada por um sistema de dois componentes de transdução de sinal, onde ocorre fosforilação da proteína reguladora, que permite que as bactérias possam detetar e responder a sinais externos, adaptando-se a uma ampla gama de ambientes, condições de *stress* e de crescimento. Estes sistemas são uma das principais modalidades de sinalização bacteriana (Stock et al., 2000). Uma vez que, ainda não foram descritos em seres humanos, esta classe de moléculas tem sido sugerida como um alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos e antifúngicos (Barrett and Hoch, 1998; Stephenson and Hoch, 2002). O sistema de dois componentes de transdução de sinal é composto por um sensor que monitoriza um parâmetro ambiental, e um regulador de resposta citoplasmático, que altera a expressão genética ou movimento celular em resposta às modificações ambientais (Stock et al., 1989). Este sistema contém uma histidina-cinase, que em resposta a um

sinal ou estímulo, autofosforila-se num resíduo de histidina específico. Por sua vez, o regulador de resposta, que recebe o grupo fosforil da histidina-cinase, fosforila num resíduo de aspartato específico (Hakenbeck and Stock, 1996; Kofoed and Parkinson, 1988). A fosforilação do regulador de resposta modifica a sua atividade catalítica e capacidade de interação com outras proteínas e com DNA (Lukat et al., 1992). Em muitos casos, a fosforilação permite ao regulador de resposta ligar-se ao DNA e funcionar como um fator de transcrição (Galperin et al., 2001). Vias de dois componentes de sinalização demonstraram ser eficazes na resposta a uma grande variedade de estímulos, incluindo açúcares, péptidos, antibióticos, e sinais de *quorum-sensing* (Steeg et al., 2003).

Existem várias famílias de reguladores de transcrição descritas, sendo a OmpR (regulador de resposta citoplasmática) uma das famílias melhor caracterizadas (Perez-Rueda and Collado-Vides, 2000).

A OmpR é uma proteína da *A. hydrophila*, que regula a expressão de porinas da membrana externa das bactérias entéricas, pertence a uma sub-família de reguladores de resposta, a maioria dos quais funcionam como fatores de transcrição, como referido anteriormente (Martinez-Hackert and Stock, 1997). O sinal característico destas proteínas de resposta de regulação é a presença de um domínio regulador conservado N-terminal que controla a atividade do domínio C-terminal de ligação ao DNA, numa reação dependente de fosforilação (Bourret et al., 1990; Itou and Tanaka, 2001; Stock et al., 1990).

As proteínas que são únicas para um determinado microrganismo patogénico, bem como essenciais para a sobrevivência da célula bacteriana, servem como potenciais alvos terapêuticos para a conceção de medicamentos eficazes contra esse mesmo agente patogénico. O facto da proteína OmpR não ocorrer em peixes nem em humanos (ou outros animais suscetíveis a infeções causadas por *Aeromonas*), torna propensa a sua utilização como potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de antibióticos contra *A. hydrophila* (Chhabra et al., 2012).

Tem sido sugerido que a produção de CMY-2 (gene que codifica para cefalosporinase e está vulgarmente disseminado em plasmídeos) em associação com a perda das OMPs (proteínas da membrana externa) mais importantes em *E. coli* pode aumentar a concentração mínima inibitória aos carbapenemos (Lartigue et al., 2007; Liu et al., 2008;

Resultados e Discussão

Poirel et al., 2004). Um estudo realizado por Oteo e co-autores sugeriu que a associação de dois mecanismos de resistência (alterações de OMPs e produção de CTX-M-67) estaria relacionado com o fenótipo de resistência a carbapenemos (Oteo et al., 2008). No entanto, no presente estudo a interrupção do gene relacionado com a proteína de transcrição provocou uma diminuição da suscetibilidade à cefotaxima e de acordo com Martinez-Martinez e colaboradores, já foram descritos mutantes deficientes em porinas, com maior resistência a cefalosporinas de espectro alargado em bactérias Gram-negativas (Martinez-Martinez et al., 1996).

Relativamente ao contexto genómico relativo ao mutante 2 (tabela I), podemos verificar que a ORF a jusante da mutação é a AHA_2999. Esta ORF encontra-se numa orientação oposta à ORF interrompida no mutante 2. Daí que terão obrigatoriamente um promotor diferente, o que pode significar que a mutação em AHA_2998 não afeta a transcrição de AHA_2999.

4.2.3 Mutante 41

Após sequenciação do mutante 41, foi possível identificar que o gene interrompido *gmd* codifica para uma GDP-manose 4,6-desidratase. Como se pode verificar pela análise da tabela I, ocorreu uma alteração na suscetibilidade à cefotaxima e na formação de biofilme que poderá estar relacionada com o gene interrompido identificado.

O gene *gmd* que codifica para uma GDP-D-manose desidratase foi descrito como pertencente aos genes envolvidos na biossíntese de lipopolissacarídeos (LPS) em *P. aeruginosa* (Lightfoot and Lam, 1993).

Em bactérias Gram-negativas, os LPS são das principais moléculas estruturais e imunodominantes da membrana externa. São constituídos por três porções nas quais se encontra inserido o antígeno (Ag) O específico. Este Ag é o componente externo de LPS, e consiste num polímero de unidades de repetição de oligossacáridos (Raetz and Whitfield, 2002).

Após sequenciação do cluster do Ag O na estirpe PPD134/91 da *A. hydrophila* foram descobertos genes que codificam para a GDP manose (Zhang et al., 2002). Estes genes quando mutados influenciam a expressão do Ag O, e por isso, interferem com o processo de adesão, colonização e resistência. A sua expressão está, normalmente,

associada a alterações de temperatura, *stress* ou expressão de virulência por parte da bactéria (Jimenez et al., 2008; Merino et al., 1991; Merino et al., 1996).

Em *P. aeruginosa*, tem sido proposto que a interação dos LPS com porinas pode influenciar a conformação das porinas e o número de poros abertos funcionais (Angus et al., 1982). Canais de imipenemo em *P. aeruginosa* encontram-se na maioria fechados na membrana livre de LPS (Ishii and Nakae, 1993). Alterações nas porinas, bem como LPS têm sido associadas com o desenvolvimento de resistência a vários antibióticos em *Burkholderia cepacia* (Rajyaguru and Muszynski, 1997). Padrões alterados de LPS e quantidades reduzidas de LPS nos mutantes resistentes podem influenciar o número de poros abertos disponíveis das porinas dos mutantes (Ghosh et al., 1999).

4.2.4 Mutante 52

Após sequenciação do mutante 52, e seguindo o mesmo procedimento aplicado para o estudo dos mutantes descritos anteriormente, foi possível identificar que o gene interrompido correspondia a uma ATPase da família AFG1. A ATPase faz parte de uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de ATP (adenosina trifosfato) dando origem a ADP (adenosina difosfato) e fosfato inorgânico, com liberação de energia.

Não foi possível identificar uma relação direta desta proteína com a resistência a antibióticos, deste modo não foi encontrada nenhuma resposta viável para as alterações apresentadas na tabela I.

Do mesmo modo que para os mutantes anteriores, foi realizado um estudo do contexto genómico onde podemos verificar que a ORF que se segue diz respeito ao gene *rplM*. No entanto, também foi detetada uma possível região promotora, o que pode significar que a transcrição do gene *rplM*, que codifica para a proteína ribossomal L13 na subunidade 50S, poderá não ser afetada pela mutação em AHA_3906.

A interrupção de um gene específico, que produz uma alteração significativa do valor de MIC, para um determinado antibiótico estará, certamente envolvida no mecanismo de resistência, constituindo um importante alvo de investigação, tal como deverá desempenhar um papel importante na resistência a agentes antimicrobianos. Deste modo, o estudo do resistoma, que compreende todos os genes que quando se encontram mutados, dão origem a uma suscetibilidade alterada, é fundamental para

Resultados e Discussão

compreendermos e identificarmos todos os genes envolvidos na resistência, ainda por descobrir.

5. Considerações finais

O presente estudo apresenta, pela primeira vez, a formação de uma biblioteca com quase 100 mutantes para *Aeromonas hydrophila*. Até aqui, ainda não tinham sido realizados estudos sobre mutagênese, particularmente para esta estirpe, com sucesso. Embora já haja estudos nesta área sobre *Aeromonas*, nenhum foi direcionado para o estudo da resistência a antibióticos. É importante referir que, apesar de não termos identificado todos os genes envolvidos na alteração da suscetibilidade aos antibióticos em estudo, e na formação de biofilme, conseguimos desenvolver mutações interrompendo genes específicos que promovem alterações na suscetibilidade a antibióticos β -lactâmicos. Contudo o trabalho aqui desenvolvido é de extrema importância para a realização de futuros estudos que o poderiam complementar. A sequenciação, identificação de todos os genes interrompidos desta biblioteca de mutantes e o estudo de todos os mecanismos aqui envolvidos, seria essencial para expandir o conhecimento do resistoma de *A. hydrophila*, proporcionando novas perspectivas nas suas respostas a β -lactâmicos e na regulação da formação de biofilme. No entanto, como conseguimos verificar, os genes identificados neste estudo poderão ter alguma relevância na clínica, e dar origem a novos alvos terapêuticos.

V. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho permitiu identificar novos determinantes genéticos, envolvidos na regulação do mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos e na formação de biofilme, embora não diretamente, a partir da criação de uma biblioteca de mutantes para *Aeromonas hydrophila* CECT 839. Os determinantes genéticos identificados, poderão constituir novos alvos de aplicação terapêutica.

Podemos retirar também as seguintes conclusões:

- Foi possível a criação de uma biblioteca de mutantes com apenas 86 mutantes resistentes à canamicina, através da técnica de mutagenese aleatória por transposição, o que revela uma reduzida eficiência de transformação para a *Aeromonas hydrophila*;
- A partir da caracterização da biblioteca de mutantes conseguiu-se verificar a estabilidade das mutações, e comprovar que as mutações foram únicas e inseridas aleatoriamente no genoma em locais diferentes;
- A avaliação fenotípica dos mutantes demonstrou que existem 17 mutantes com alteração de suscetibilidade a antibióticos β -lactâmicos e alteração da formação de biofilme em simultâneo: 5 mutantes mostraram aumentar a suscetibilidade ao IMP, 11 apresentaram diminuição da suscetibilidade à CTX e 1 mutante mostrou aumento da suscetibilidade ao IMP e diminuição da suscetibilidade para CTX em simultâneo, comparado com a estirpe parental.
- Foi possível a identificação de 4 determinantes genéticos que poderão estar a contribuir para os fenótipos de resistência a β -lactâmicos e a formação de biofilme: uma proteína reguladora da transcrição, uma ATPase, uma GDP-manose 4,6-desidratase e uma proteína hipotética com função desconhecida, a partir da determinação do local de inserção do transposão.

VI. PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho tinha como principal objetivo o estabelecimento de um protocolo e a otimização das suas metodologias que permitissem criar uma biblioteca de mutantes de inserção por transposição, em *Aeromonas hydrophila*. Consequentemente, foi possível a caracterização da coleção de mutantes obtidos, relativamente aos fenótipos de suscetibilidade a antibióticos β -lactâmicos, permitindo a identificação de determinantes genéticos potencialmente envolvidos nos mecanismos de regulação deste tipo de resistência antimicrobiana. Tendo em conta os resultados preliminares, é agora necessário o isolamento das ORFs identificadas para testar se a alteração de fenótipo de resistência é resultado de um único gene (ORF interrompida em cada um dos mutantes) ou se, pelo contrário, é produto da sinergia de diferentes genes. Deste modo, como trabalho futuro, seria pertinente clonar e expressar cada um dos genes identificados para melhor caracterizar a sua função nos mecanismos de regulação da resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

Este estudo também permitiu relacionar a suscetibilidade dos mutantes aos antibióticos com a sua capacidade de formação de biofilme. Neste sentido, no futuro, seria interessante, avaliar a função das ORFs associadas a alterações fenotípicas de resistência, na sinalização entre microrganismos, já que *Quorum-sensing* é o mecanismo de comunicação microbiana intimamente relacionado com os biofilmes.

Para complemento, poder-se-á considerar a proteómica com estratégia para avaliar a expressão diferencial de proteína entre os mutantes obtidos e a estirpe parental, o que permitirá identificar proteínas cuja expressão é afetada pela mutação, ou seja novas moléculas relevantes em termos de resistência antimicrobiana.

Estas são só algumas possibilidades de investigação futura, uma vez que, o trabalho desenvolvido, foi apenas o primeiro passo de uma longa jornada para o conhecimento dos mecanismos de resistência.

Para além do exposto, a coleção de mutantes gerada pode ser ampliada e considerada, não só para investigação no âmbito da suscetibilidade a agentes antimicrobianos, mas também para estudos que visem a caracterização da espécie *A. hydrophila* em outras vertentes, como a virulência, a tolerância a metais ou desinfetantes, entre outras.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, S.L., Cheung, W.K., Janda, J.M., 2003. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of clinical microbiology* 41, 2348-2357.
- Ahmed, N.A., Petersen, F.C., Scheie, A.A., 2009. *AI-2/LuxS* is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 4258-4263.
- Alksne, L.E., Rasmussen, B.A., 1997. Expression of the *AsbA1*, *OXA-12*, and *AsbM1* beta-lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. *Journal of bacteriology* 179, 2006-2013.
- Alperi, A., Martinez-Murcia, A.J., Ko, W.C., Monera, A., Saavedra, M.J., Figueras, M.J., 2010a. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60, 2048-2055.
- Alperi, A., Martinez-Murcia, A.J., Monera, A., Saavedra, M.J., Figueras, M.J., 2010b. *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60, 72-77.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25, 3389-3402.
- Angus, B.L., Carey, A.M., Caron, D.A., Kropinski, A.M., Hancock, R.E., 1982. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 21, 299-309.
- Arber, W., 1979. Promotion and limitation of genetic exchange. *Science* 205, 361-365.
- Avison, M.B., Niumsup, P., Nurmahomed, K., Walsh, T.R., Bennett, P.M., 2004. Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* beta-lactamase regulator, *BlrA*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 53, 197-202.
- Babic, M., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 9, 142-156.
- Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P., Hoiby, N., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 1175-1187.
- Balsalobre, L.C., Dropa, M., Lincopan, N., Mamizuka, E.M., Matte, G.R., Matte, M.H., 2009. Detection of metallo-beta-lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. *Letters in applied microbiology* 49, 142-145.
- Balsalobre, L.C., Dropa, M., Oliveira, D. E., Lincopan, N., Mamizuka, E. M. , Matté, G. R., Matté, M. H., 2010. Presence of *bla*_{TEM-116} gene in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas Jandaei* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 718-719.
- Barbati, S., Grenga, L., Luzi, G., Paolozzi, L., Ghelardini, P., 2010. Prokaryotic division interactome: setup of an assay for protein-protein interaction mutant selection. *Research in microbiology* 161, 118-126.

Bibliografia

- Barillo, D.J., McManus, A.T., Cioffi, W.G., McManus, W.F., Kim, S.H., Pruitt, B.A., Jr., 1996. *Aeromonas* bacteraemia in burn patients. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 22, 48-52.
- Barreto, N.S.E., Carvalho, F. C. T., Vieira, R. H. S. F., Reis, C. M. F., Macrae, A., Rodrigues, D. P., 2010. Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 452-460.
- Barrett, J.F., Hoch, J.A., 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 1529-1536.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M.J., Romalde, J.L., 2009. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Systematic and applied microbiology* 32, 471-479.
- Boari, C.A., Alves, M. P., Tebaldi, V. M. R., Savian, T. V., Piccoli, R. H., 2009. Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different conditions of cultivation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*.
- Boehm, A., Steiner, S., Zaehring, F., Casanova, A., Hamburger, F., Ritz, D., Keck, W., Ackermann, M., Schirmer, T., Jenal, U., 2009. Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. *Molecular microbiology* 72, 1500-1516.
- Bourret, R.B., Hess, J.F., Simon, M.I., 1990. Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 41-45.
- Brazas, M.D., Hancock, R.E., 2005. Using microarray gene signatures to elucidate mechanisms of antibiotic action and resistance. *Drug discovery today* 10, 1245-1252.
- Breidenstein, E.B., Khaira, B.K., Wiegand, I., Overhage, J., Hancock, R.E., 2008. Complex ciprofloxacin resistome revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 4486-4491.
- Burmolle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sorensen, S.J., Kjelleberg, S., 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology* 72, 3916-3923.
- Bush, K., 1999. beta-Lactamases of increasing clinical importance. *Current pharmaceutical design* 5, 839-845.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39, 1211-1233.
- Calhau, V., Tacao, M., Morgado, F., Correia, A., Henriques, I., 2010. PCR-DGGE-based methodologies to assess diversity and dynamics of *Aeromonas* communities. *Journal of applied microbiology* 108, 611-623.
- Casey, J., Davidson, N., 1977. Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucleic acids research* 4, 1539-1552.
- Chain, E., Florey, H., Gardner, A., Heatley, N., Jennings, M., Orr-ewing, J., Sanders, A. , 1940. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 2, 226-228.
- Chauret, C., Volk, C., Creason, R., Jarosh, J., Robinson, J., Warnes, C., 2001. Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. *Canadian journal of microbiology* 47, 782-786.

- Chhabra, G., Upadhyaya, T., Dixit, A., 2012. Molecular cloning, sequence analysis and structure modeling of OmpR, the response regulator of *Aeromonas hydrophila*. *Molecular biology reports* 39, 41-50.
- Cirz, R.T., O'Neill, B.M., Hammond, J.A., Head, S.R., Romesberg, F.E., 2006. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *Journal of bacteriology* 188, 7101-7110.
- Clement, A., Tamalet, A., Leroux, E., Ravilly, S., Fauroux, B., Jais, J.P., 2006. Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: A double blind, placebo controlled trial. *Thorax* 61, 895-902.
- CLSI, 2006. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline. M45-P., Vol 25. Wayne, PA USA.
- Colwell, R.R., MacDonell, M. T. and DeLey, J, 1986. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 473-477.
- Crowder, M.W., Spencer, J., Vila, A.J., 2006. Metallo-beta-lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria. *Accounts of chemical research* 39, 721-728.
- Daskalov, H., 2006. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control* 17, 474-483.
- Demain, A.L., Elander, R.P., 1999. The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 5-19.
- Demarta, A., Kupfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., Monera, A., Jose Saavedra, M., Martinez-Murcia, A., 2008. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Systematic and applied microbiology* 31, 278-286.
- Derderian, S.L., 2007. Alexander Fleming's Miraculous Discovery of Penicillin. *River Academic Journal* 3.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* 15, 167-193.
- Dumontet, S., Krovacek, K., Svenson, S.B., Pasquale, V., Baloda, S.B., Figliuolo, G., 2000. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of Southern Italy. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 23, 53-72.
- Elliott, D., Burns, J.L., Hoffman, L.R., 2010. Exploratory study of the prevalence and clinical significance of tobramycin-mediated biofilm induction in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54, 3024-3026.
- EPA, 1998. Announcement of the drinking water Contaminant Candidate List. Fed. Regist. Epa. J63, 10274-10287.
- Fengqing, H., Song, Y., 2005. Electroporation-mediated transformation of *Aeromonas hydrophila*. *Plasmid* 54, 283-287.
- Figueras, M.J., Alperi, A., Beaz-Hidalgo, R., Stackebrandt, E., Brambilla, E., Monera, A., Martinez-Murcia, A.J., 2011. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61, 242-248.

Bibliografia

- Flemming, A., 1929. Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *Brit. J. Exp. Pathol.* 10, 226-236.
- Frank, K.L., Reichert, E.J., Piper, K.E., Patel, R., 2007. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 888-895.
- French, G.L., 2005. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Advanced drug delivery reviews* 57, 1514-1527.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., Koonin, E.V., 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS microbiology letters* 203, 11-21.
- Gavriel, A.A., Landre, J.P., Lamb, A.J., 1998. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in North-East Scotland. *J. Appl. Microbiol.* 84, 383-392.
- Ghenghesh, K.S., Ahmed, S.F., El-Khalek, R.A., Al-Gendy, A., Klena, J., 2008. *Aeromonas*-associated infections in developing countries. *Journal of infection in developing countries* 2, 81-98.
- Ghosh, A.S., Kar, A.K., Kundu, M., 1999. Impaired imipenem uptake associated with alterations in outer membrane proteins and lipopolysaccharides in imipenem-resistant *Shigella dysenteriae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 43, 195-201.
- Giedraitiene, A., Vitkauskienė, A., Naginiene, R., Pavilionis, A., 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)* 47, 137-146.
- Giske, C.G., Buaro, L., Sundsfjord, A., Wretling, B., 2008. Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 14, 23-30.
- Hakenbeck, R., Stock, J.B., 1996. Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods in enzymology* 273, 281-300.
- Hare, R., 1982. New light on the history of penicillin. *Medical history* 26, 1-24.
- Harf-Monteil, C., Fleche, A.L., Riegel, P., Prevost, G., Bermond, D., Grimont, P.A., Monteil, H., 2004. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54, 481-485.
- Henriques, I., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A., 2006a. Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS microbiology ecology* 56, 418-429.
- Henriques, I.S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A., 2006b. Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in microbiology* 157, 938-947.
- Hernandez Valladares, M., Kiefer, M., Heinz, U., Soto, R.P., Meyer-Klaucke, W., Nolting, H.F., Zeppezauer, M., Galleni, M., Frere, J.M., Rossolini, G.M., Amicosante, G., Adolph, H.W., 2000. Kinetic and spectroscopic characterization of native and metal-substituted beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036. *FEBS letters* 467, 221-225.
- Hoffman, L.M., Jendrisak, J.J., Meis, R.J., Goryshin, I.Y., Reznikof, S.W., 2000. Transposome insertional mutagenesis and direct sequencing of microbial genomes. *Genetica* 108, 19-24.
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., Miller, S.I., 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436, 1171-1175.

- Hoiby, N., 1993. Antibiotic therapy for chronic infection of pseudomonas in the lung. Annual review of medicine 44, 1-10.
- Iaconis, J.P., Sanders, C.C., 1990. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in Aeromonas spp. Antimicrobial agents and chemotherapy 34, 44-51.
- Ichimiya, T., Takeoka, K., Hiramatsu, K., Hirai, K., Yamasaki, T., Nasu, M., 1996. The influence of azithromycin on the biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa in vitro. Chemotherapy 42, 186-191.
- Igbinosa, I.H., Igumbor, E.U., Aghdasi, F., Tom, M., Okoh, A.I., 2012. Emerging Aeromonas species infections and their significance in public health. TheScientificWorldJournal 2012, 625023.
- Igbinosa, I.H., Okoh, A.I., 2012. Antibiotic susceptibility profile of Aeromonas species isolated from wastewater treatment plant. TheScientificWorldJournal 2012, 764563.
- Ishii, J., Nakae, T., 1993. Lipopolysaccharide promoted opening of the porin channel. FEBS letters 320, 251-255.
- Isonhood, J.H., Drake, M., 2002. Aeromonas species in foods. Journal of food protection 65, 575-582.
- Itou, H., Tanaka, I., 2001. The OmpR-family of proteins: insight into the tertiary structure and functions of two-component regulator proteins. Journal of biochemistry 129, 343-350.
- Jaffe, A., Chabbert, Y.A., Semonin, O., 1982. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. Antimicrobial agents and chemotherapy 22, 942-948.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 1999. Unusual food-borne pathogens. Listeria monocytogenes, Aeromonas, Plesiomonas, and Edwardsiella species. Clinics in laboratory medicine 19, 553-582.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clinical microbiology reviews 23, 35-73.
- Janda, J.M., Duffey, P.S., 1988. Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. Reviews of infectious diseases 10, 980-997.
- Jefferson, K.K., 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS microbiology letters 236, 163-173.
- Jimenez, N., Canals, R., Salo, M.T., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J.M., 2008. The Aeromonas hydrophila wb*O34 gene cluster: genetics and temperature regulation. Journal of bacteriology 190, 4198-4209.
- Kampfer, P., Christmann, C., Swings, J., Huys, G., 1999. In vitro susceptibilities of Aeromonas genomic species to 69 antimicrobial agents. Systematic and applied microbiology 22, 662-669.
- Kaplan, J.B., 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. The International journal of artificial organs 34, 737-751.
- Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Karwacki, M.T., Kim, S., Bose, J.L., Bayles, K.W., Horswill, A.R., 2012. Low Levels of beta-Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in Staphylococcus aureus. mBio 3.
- Kivanc, M., Yilmaz, M., Demir, F., 2011. The occurrence of Aeromonas in drinking water, tap water and the Porsuk river. Brazilian Journal of Microbiology 42, 126-131.

Bibliografia

- Ko, W.C., Wu, H.M., Chang, T.C., Yan, J.J., Wu, J.J., 1998. Inducible beta-lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: therapeutic challenge for antimicrobial therapy. *Journal of clinical microbiology* 36, 3188-3192.
- Kofoed, E.C., Parkinson, J.S., 1988. Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 4981-4985.
- Kong, K.F., Schneper, L., Mathee, K., 2010. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 118, 1-36.
- Kotra, L.P., Mobashery, S., 1999. Mechanistic and clinical aspects of beta-lactam antibiotics and beta-lactamases. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 47, 211-216.
- Krovacek, K., Pasquale, V., Baloda, S.B., Soprano, V., Conte, M., Dumontet, S., 1994. Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the marine environment and human diarrheal cases in southern Italy. *Applied and environmental microbiology* 60, 1379-1382.
- Krzyminska, S., Kaznowski, A., Chodysz, M., 2009. *Aeromonas* spp. human isolates induce apoptosis of murine macrophages. *Current microbiology* 58, 252-257.
- Lartigue, M.F., Poirel, L., Poyart, C., Reglier-Poupet, H., Nordmann, P., 2007. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerging infectious diseases* 13, 315-317.
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P., 2012. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic acids research* 40, D302-305.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C., Roy, P.H., 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39, 185-191.
- Levy, S.B., 2005. Antibiotic resistance-the problem intensifies. *Advanced drug delivery reviews* 57, 1446-1450.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, J., Liu, R., Gu, X., Zhang, Y., Wang, Z., 2009. Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environmental microbiology* 11, 1506-1517.
- Li, Q., Xiao, X., Wang, F., 2007a. Screening of genes involved in chitinase production in *Aeromonas caviae* CB101 via transposon mutagenesis. *Journal of applied microbiology* 102, 640-649.
- Li, X.Z., Mehrotra, M., Ghimire, S., Adewoye, L., 2007b. beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary microbiology* 121, 197-214.
- Licking, E., 1999. Getting a grip on bacterial slime. *Business Week* 13, 98-100.
- Lightfoot, J., Lam, J.S., 1993. Chromosomal mapping, expression and synthesis of lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for guanosine diphospho (GDP)-D-mannose. *Molecular microbiology* 8, 771-782.
- Lin, J., Wang, Y., Hoang, K.V., 2009. Systematic identification of genetic loci required for polymyxin resistance in *Campylobacter jejuni* using an efficient in vivo transposon mutagenesis system. *Foodborne pathogens and disease* 6, 173-185.
- Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F., Martinez, J.L., 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19484-19489.

- Liu, Y.F., Yan, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Wu, J.J., 2008. Characterization of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* isolates from a university hospital in Taiwan. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 61, 1020-1023.
- Livermore, D.M., 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews* 8, 557-584.
- Lofblom, J., Kronqvist, N., Uhlen, M., Stahl, S., Wernerus, H., 2007. Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism. *Journal of applied microbiology* 102, 736-747.
- Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M., Stock, J.B., 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 718-722.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E., Williams, P., 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental microbiology* 4, 18-28.
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., Dessen, A., 2006. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS microbiology reviews* 30, 673-691.
- Mah, T.F., O'Toole, G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* 9, 34-39.
- Majiduddin, F.K., Materon, I.C., Palzkill, T.G., 2002. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International journal of medical microbiology : IJMM* 292, 127-137.
- Martin-Carnahan, A., Joseph, S. W., 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 2, 2^a Edition.
- Martinez-Hackert, E., Stock, A.M., 1997. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *Journal of molecular biology* 269, 301-312.
- Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., Alberti, S., Tomas, J.M., Benedi, V.J., Jacoby, G.A., 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40, 342-348.
- Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Hernandez-Alles, S., Alvarez-Diaz, D., Suarez, A.I., Tran, J., Benedi, V.J., Jacoby, G.A., 1999. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 1669-1673.
- Martinez-Murcia, A.J., Saavedra, M.J., Mota, V.R., Maier, T., Stackebrandt, E., Cousin, S., 2008. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58, 1169-1175.
- Massidda, O., Rossolini, G.M., Satta, G., 1991. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *Journal of bacteriology* 173, 4611-4617.
- Massova, I., Mobashery, S., 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 1-17.
- McCann, J.R., McDonough, J.A., Sullivan, J.T., Feltcher, M.E., Braunstein, M., 2011. Genome-wide identification of *Mycobacterium tuberculosis* exported proteins with roles in intracellular growth. *Journal of bacteriology* 193, 854-861.

Bibliografia

- Méndez-Vilas, A., 2010. Protein-protein interaction mutants to study structure and assembly of cellular machineries: its application to the prokaryotic divisome. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1576-1581.
- Merino, S., Camprubi, S., Tomas, J.M., 1991. The role of lipopolysaccharide in complement-killing of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *Journal of general microbiology* 137, 1583-1590.
- Merino, S., Rubires, X., Aguillar, A., Guillot, J.F., Tomas, J.M., 1996. The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization in vivo of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microbial pathogenesis* 20, 325-333.
- Merino, S., Rubires, X., Knochel, S., Tomas, J.M., 1995. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *International journal of food microbiology* 28, 157-168.
- Merritt, J.H., Kadouri, D.E., O'Toole, G.A., 2011. Growing and analyzing static biofilms. *Current protocols in microbiology* Chapter 1, Unit 1B 1.1.
- Minana-Galbis, D., Farfan, M., Fuste, M.C., Loren, J.G., 2004. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 54, 2073-2078.
- Minana-Galbis, D., Farfan, M., Fuste, M.C., Loren, J.G., 2007. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, 582-587.
- Minana-Galbis, D., Farfan, M., Gaspar Loren, J., Carmen Fuste, M., 2010. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Systematic and applied microbiology* 33, 15-19.
- Minnaganti, V.R., Patel, P.J., Iancu, D., Schoch, P.E., Cunha, B.A., 2000. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila*. *Heart & lung : the journal of critical care* 29, 306-308.
- Mirani, Z.A., Jamil, N., 2011. Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of basic microbiology* 51, 191-195.
- Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current opinion in biotechnology* 14, 255-261.
- Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., Correia, A., 2007. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 60, 1243-1250.
- Nakae, T., Nakajima, A., Ono, T., Saito, K., Yoneyama, H., 1999. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 1301-1303.
- Nicolau, D.P., 2008. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert opinion on pharmacotherapy* 9, 23-37.
- Nikaido, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264, 382-388.
- Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 67, 593-656.

- Niumsup, P., Simm, A.M., Nurmahomed, K., Walsh, T.R., Bennett, P.M., Avison, M.B., 2003. Genetic linkage of the penicillinase gene, amp, and blrAB, encoding the regulator of beta-lactamase expression in *Aeromonas* spp. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51, 1351-1358.
- Nucleo, E., Steffanoni, L., Fugazza, G., Migliavacca, R., Giacobone, E., Navarra, A., Pagani, L., Landini, P., 2009. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *BMC microbiology* 9, 270.
- Odenholt, I., 2001. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *International journal of antimicrobial agents* 17, 1-8.
- Oteo, J., Delgado-Iribarren, A., Vega, D., Bautista, V., Rodriguez, M.C., Velasco, M., Saavedra, J.M., Perez-Vazquez, M., Garcia-Cobos, S., Martinez-Martinez, L., Campos, J., 2008. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *International journal of antimicrobial agents* 32, 534-537.
- Overman, T.L., Janda, J.M., 1999. Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* biotype *veronii*. *Journal of clinical microbiology* 37, 706-708.
- Pages, J.M., James, C.E., Winterhalter, M., 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 6, 893-903.
- Palu, A.P., Gomes, L.M., Miguel, M.A., Balassiano, I.T., Queiroz, M.L., Freitas-Almeida, A.C., de Oliveira, S.S., 2006. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food microbiology* 23, 504-509.
- Parra-Lopez, C., Baer, M.T., Groisman, E.A., 1993. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *The EMBO journal* 12, 4053-4062.
- Perez-Rueda, E., Collado-Vides, J., 2000. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research* 28, 1838-1847.
- Piddock, L.J., 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews* 19, 382-402.
- Pidiyar, V., Kaznowski, A., Narayan, N.B., Patole, M., Shouche, Y.S., 2002. *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52, 1723-1728.
- Poirel, L., Heritier, C., Spicq, C., Nordmann, P., 2004. In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology* 42, 3831-3833.
- Poole, K., 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61, 2200-2223.
- Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56, 20-51.
- Popoff, M.Y., Coynault, C., Kiredjian, M., Lemelin, M., 1981. Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr. Microbiol.* 5, 109-114.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P., 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 181, 5993-6002.

Bibliografia

- Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., Landman, D., 2006. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 1633-1641.
- Raetz, C.R., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry* 71, 635-700.
- Rajyaguru, J.M., Muszynski, M.J., 1997. Association of resistance to trimethoprim/sulphamethoxazole, chloramphenicol and quinolones with changes in major outer membrane proteins and lipopolysaccharide in *Burkholderia cepacia*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 40, 803-809.
- Rasmussen, B.A., Bush, K., 1997. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41, 223-232.
- Riess, T., Anderson, B., Fackelmayer, A., Autenrieth, I.B., Kempf, V.A., 2003. Rapid and efficient transposon mutagenesis of *Bartonella henselae* by transposome technology. *Gene* 313, 103-109.
- Rolinson, G.N., 1998. Forty years of beta-lactam research. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 41, 589-603.
- Saavedra, M.J., Figueras, M.J., Martinez-Murcia, A.J., 2006. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56, 2481-2487.
- Saavedra, M.J., Guedes-Novais, S., Alves, A., Rema, P., Tacao, M., Correia, A., Martinez-Murcia, A., 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 7, 207-211.
- Saha, P., Chakrabarti, T., 2006. *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 56, 1905-1909.
- Sambrook J., F.E., Maniatis T., 1990. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez-Céspedes, J., Figueras, M.J., Aspiroz, C., Aldea, M.J., Toledo, M., Alperi, A., Marco, F., Vila, J., 2009. Development of imipenem resistance in an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* clinical isolate recovered from a patient with cholangitis. *Journal of medical microbiology* 58, 451-455.
- Schadow, K.H., Simpson, W.A., Christensen, G.D., 1988. Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *The Journal of infectious diseases* 157, 71-77.
- Schurek, K.N., Marr, A.K., Taylor, P.K., Wiegand, I., Semenec, L., Khaira, B.K., Hancock, R.E., 2008. Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 4213-4219.
- Seshadri, R., Joseph, S.W., Chopra, A.K., Sha, J., Shaw, J., Graf, J., Haft, D., Wu, M., Ren, Q., Rosovitz, M.J., Madupu, R., Tallon, L., Kim, M., Jin, S., Vuong, H., Stine, O.C., Ali, A., Horneman, A.J., Heidelberg, J.F., 2006. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *Journal of bacteriology* 188, 8272-8282.
- Simona, F., Magistrato, A., Dal Peraro, M., Cavalli, A., Vila, A.J., Carloni, P., 2009. Common mechanistic features among metallo-beta-lactamases: a computational study of *Aeromonas hydrophila* CphA enzyme. *The Journal of biological chemistry* 284, 28164-28171.

- Sousa, J.C., 2006. Manual de Antibióticos Antibacterianos, 2ª Edição Edition Fundação Fernando Pessoa 107 - 315 pp.
- Steeg, P.S., Palmieri, D., Ouatas, T., Salerno, M., 2003. Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer. *Cancer letters* 190, 1-12.
- Stephenson, K., Hoch, J.A., 2002. Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets. *Current opinion in pharmacology* 2, 507-512.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Goudreau, P.N., 2000. Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry* 69, 183-215.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stock, A.M., 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiological reviews* 53, 450-490.
- Stock, J.B., Stock, A.M., Mottonen, J.M., 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature* 344, 395-400.
- Subramanian, P., Shanmugam, N., Sivaraman, U., Kumar, S., Selvaraj, S., 2012. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. *The Australasian medical journal* 5, 344-348.
- Tayler, A.E., Ayala, J.A., Niumsup, P., Westphal, K., Baker, J.A., Zhang, L., Walsh, T.R., Wiedemann, B., Bennett, P.M., Avison, M.B., 2010. Induction of beta-lactamase production in *Aeromonas hydrophila* is responsive to beta-lactam-mediated changes in peptidoglycan composition. *Microbiology* 156, 2327-2335.
- Therrien, C., Levesque, R.C., 2000. Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS microbiology reviews* 24, 251-262.
- Tipper, D.J., Strominger, J.L., 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54, 1133-1141.
- Tsai, M.S., Kuo, C.Y., Wang, M.C., Wu, H.C., Chien, C.C., Liu, J.W., 2006. Clinical features and risk factors for mortality in *Aeromonas* bacteremic adults with hematologic malignancies. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 39, 150-154.
- Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., Plesiat, P., Pechere, J.C., Tulkens, P.M., 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51, 1055-1065.
- van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology* 2, 203.
- Vila, J., Marco, F., Soler, L., Chacon, M., Figueras, M.J., 2002. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 49, 701-702.
- Vila, J., Ruiz, J., Gallardo, F., Vargas, M., Soler, L., Figueras, M.J., Gascon, J., 2003. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerging infectious diseases* 9, 552-555.
- Vollmer, W., 2006. The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? *Applied microbiology and biotechnology* 73, 37-47.

Bibliografia

- Wagner, T., Soong, G., Sokol, S., Saiman, L., Prince, A., 2005. Effects of azithromycin on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Chest* 128, 912-919.
- Walsh, T.R., Hall, L., MacGowan, A.P., Bennett, P.M., 1995a. Sequence analysis of two chromosomally mediated inducible beta-lactamases from *Aeromonas sobria*, strain 163a, one a class D penicillinase, the other an AmpC cephalosporinase. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 36, 41-52.
- Walsh, T.R., Payne, D.J., MacGowan, A.P., Bennett, P.M., 1995b. A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible beta-lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 35, 271-279.
- Walsh, T.R., Stunt, R.A., Nabi, J.A., MacGowan, A.P., Bennett, P.M., 1997. Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 40, 171-178.
- Wegener, H.C., Frimodt-Moller, N., 2000. Reducing the use of antimicrobial agents in animals and man. *Journal of medical microbiology* 49, 111-113.
- White, D., 2000. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes* Oxford University Press, 2^a Edition.
- Wiegand, I., Marr, A.K., Breidenstein, E.B., Schurek, K.N., Taylor, P., Hancock, R.E., 2008. Mutator genes giving rise to decreased antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 3810-3813.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., Strynadka, N.C., 2005. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current opinion in microbiology* 8, 525-533.
- Wright, G.D., 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews. Microbiology* 5, 175-186.
- Yamada, M., Watanabe, T., Baba, N., Takeuchi, Y., Ohsawa, F., Gomi, S., 2008. Crystal structures of biapenem and tebipenem complexed with penicillin-binding proteins 2X and 1A from *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52, 2053-2060.
- Yanez, M.A., Catalan, V., Apraiz, D., Figueras, M.J., Martinez-Murcia, A.J., 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53, 875-883.
- Zhang, Y.L., Arakawa, E., Leung, K.Y., 2002. Novel *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 genes involved in O-antigen and capsule biosynthesis. *Infection and immunity* 70, 2326-2335.
- Zhiyong, Z., L. Xiaojun, and G. Yanyu, 2002. *Aeromonas hydrophila* infection: clinical aspects and therapeutic options. *Rev. Med. Microbiol.* 13, 151-162.

VIII. ANEXOS

Anexo 1

Tabela II – Oligonucleóticos usados neste estudo

Par de primers	Sequência (5'-3')	Referência
gyrB3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	(Yanez et al., 2003)
gyrB14R	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC	
KanF	ATGAGCCATATTCAACGGGAA	(Li et al., 2007a)
KanR	TTAGAAAACTCATCGAGCAT	
Inv-2	GAACTTTGTCTGAGTTGAAGGATCA	Epicentre®
Kan2-FP1	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	Epicentre®

Anexo 2

Fig. 17 - Marcador de peso molecular Gene Ruler™ DNA Ladder MIX (Fermentas)

